



RECEIVED

DEC 06 2002

TECH CENTER 1600/2900

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE CERTIFIÉE CONFORME

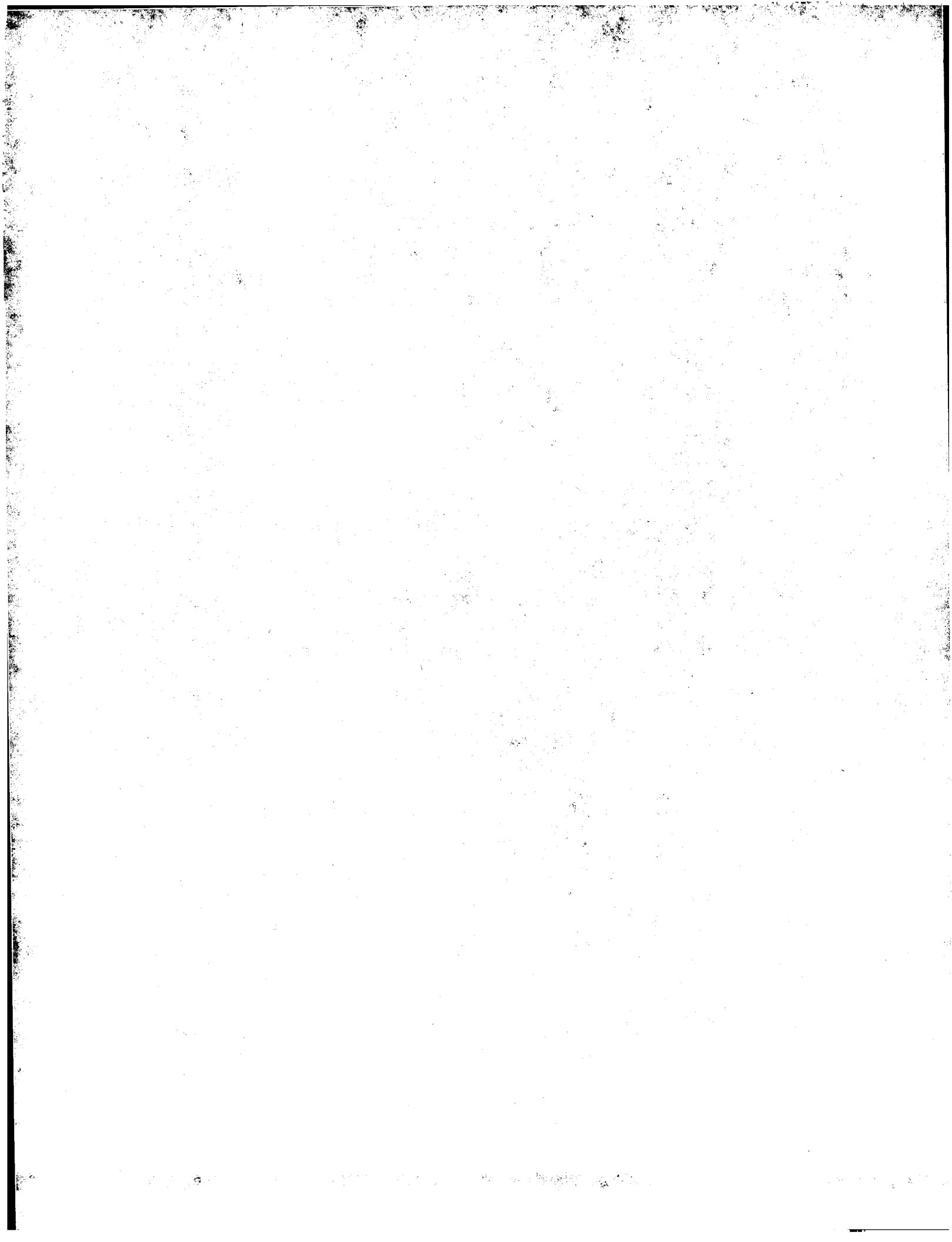
Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le titre de propriété industrielle, correspondant à la demande ci-annexée, a été délivré le 02 novembre 2001

Fait à Paris le

19 NOV 2002

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets


Martine PLANCHE



REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

Reserve à l'INPI

DATE DE REMISE DES PIÈCES

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

28 JUL 1997

97 09587 -

DÉPARTEMENT DE DÉPÔT

K

DATE DE DÉPÔT

28 JUL 1997

2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle

☒ brevet d'invention

☐ demande divisionnaire

☐ certificat d'utilité

☐ transformation d'une demande de brevet européen

☐ demande initiale

☐ brevet d'invention

n° du pouvoir permanent

références du correspondant

téléphone

F17B19+1FR

01.47.03.67.77

☐ certificat d'utilité n°

date

Établissement du rapport de recherche

☐ diffère

☒ immédiat

Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance

☐

oui

☐

non

Titre de l'invention (200 caractères maximum)

NOUVEAU CANAL CATIONIQUE NEURONAL DE MAMMIFERE SENSIBLE A L'ACIDITE, SON CLONAGE ET SES APPLICATIONS.

3 DEMANDEUR (S)

n° SIREN

code APE-NAF

Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination

Centre National de la Recherche Scientifique -CNRS-

Forme juridique

Nationalité (s) FRANCAISE

Adresse (s) complète (s)

3, rue Michel Ange
75015 PARIS

Pays

FRANCE

En cas d'insuffisance de place, poursuivre sur papier libre ☐

4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs

☐ oui

☒ non

Si la réponse est non, fournir une désignation séparée

5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES

☐ requise pour la 1ère fois

☐ requise antérieurement au dépôt : joindre copie de la décision d'admission

6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE

pays d'origine

numéro

date de dépôt

nature de la demande

FRANCE

97/01574

11/02/97

BREVET

7 DIVISIONS antérieures à la présente demande n°

date

n°

date

8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE

(nom et qualité du signataire - n° d'inscription)

Marc MAJEROWICZ
960703

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION . SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI

DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR

(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

DIVISION ADMINISTRATIVE DES BREVETS

26bis, rue de Saint-Petersbourg
75800 Paris Cedex 08

Tél. 01 53 04 53 04 - Télécopie 01 42 93 59 30 F 17B19+1FR

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

97/09587

TITRE DE L'INVENTION :

NOUVEAU CANAL CATIONIQUE NEURONAL DE MAMMIFERE SENSIBLE A L'ACIDITE, SON CLONAGE ET SES APPLICATIONS

LE(S) SOUSSIGNÉ(S)

BREESE - MAJEROWICZ
3, avenue de l'Opéra
75001 PARIS

DÉSIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :

- WALDMANN Rainer
Chemin de Chense
83600 LES ADRETS DE L'ESTEREL
- LINGUEGLIA Eric
20 Bd Dubouchage
06000 Nice
- BASSILANA Frédéric
Villa les Tilleuls
992, Route de Grasse
06620 GOURDON
- LAZDUNSKI Michel
21, avenue Colombo
06000 NICE
- CHAMPIGNY Guy
3, place Carrée
06560 VALBONNE
- HEURTEAUX Catherine
Résidence Elvira Hills D1
1187, Route de St Jean
06600 ANTIBES

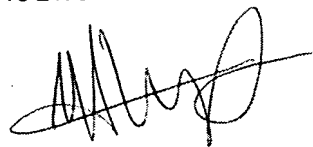
NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire

Le

10 octobre 1997

Marc MAJEROWICZ
960703



DOCUMENT COMPORTANT DES MODIFICATIONS

PAGE(S) DE LA DESCRIPTION OU DES REVENDI- CATIONS OU PLANCHE(S) DE DESSIN			R.M.*	DATE DE LA CORRESPONDANCE	TAMPON DATEUR DU CORRECTEUR
Modifiée(s)	Supprimée(s)	Ajoutée(s)			
7.49=47		48	X	12/02/98	11 MARS 1998 . 0 L
44248			X	05/10/98	08 ... 08

Un changement apporté à la rédaction des revendications d'origine, sauf si celui-ci découle des dispositions de l'article 28 du décret du 19 septembre 1979, est signalé par la mention "R.M." (revendications modifiées).

NOUVEAU CANAL CATIONIQUE NEURONAL DE
MAMMIFÈRE SENSIBLE A L'ACIDITÉ, SON CLONAGE ET SES
APPLICATIONS.

5 La présente invention concerne une nouvelle
famille de canaux ioniques de mammifère, notamment humain,
sensible à l'acidité. Elle concerne plus particulièrement
l'identification et la caractérisation moléculaire, chez
l'homme et le rat, d'un nouveau canal cationique activé
10 par les protons, dénommé ci-après "ASIC" pour désigner les
termes anglais "Acid Sensing Ionic Channel". Le canal ASIC
constitue le premier membre d'un groupe de canaux
cationiques, appartenant à la famille des canaux sodium de
dégénérine sensible à l'amiloride (6, 11-14), qui est
15 activé transitoirement par une acidification
extracellulaire.

La sensibilité à l'acide est associée à la
fois à la nociception (1) et à la transduction du goût
(2). La stimulation de neurones sensoriels par les acides
revêt une grande importance, car l'acidité accompagne de
20 nombreuses situations inflammatoires et ischémiques
douloureuses. La douleur causée par les acides est
interprétée comme étant médiée par des canaux cationiques
présents au niveau des neurones sensoriels, et qui sont
25 activés par les protons (3-5). Les propriétés biophysiques
et pharmacologiques des canaux ASIC de l'invention sont
proches de celles des canaux cationiques activés par les
protons décrits dans les neurones sensoriels (3, 15, 16).
Toutefois, comme cela apparaîtra dans la description ci-
30 après, il n'a été à ce jour jamais décrit de canaux
ioniques activés par un ligand plus simple que les canaux
ASIC.

La présente invention a donc pour objet une
35 protéine constituant un canal cationique neuronal sensible

à l'amiloride et activé par les protons. Plus particulièrement l'invention concerne la protéine constituant le canal ASIC dont la séquence en acides aminés est représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID No : 1 ou un dérivé fonctionnellement équivalent de cette protéine.

De tels dérivés sont ceux dont la séquence comprend une modification et/ou une suppression et/ou une addition d'un ou plusieurs résidus d'acides aminés, dès lors que cette modification et/ou suppression et/ou addition ne modifie pas les propriétés fonctionnelles et structurelles du canal ASIC, principalement son activation par les protons. De tels dérivés peuvent être analysés par l'homme du métier selon les techniques décrites dans les exemples donnés ci-après qui ont permis de mettre en évidence les propriétés biophysiques et pharmacologiques du canal ASIC.

Un exemple d'un tel dérivé fonctionnellement équivalent, est la protéine ASIC humaine dont la séquence en acides aminés est représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID No : 2, et qui est sensiblement identique à celle du canal ASIC de rat, désigné ASIC1A, représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID No : 1.

Un autre exemple d'un tel dérivé fonctionnellement équivalent, est la protéine constituant un canal cationique de dégénérine dénommé "MDEG" (14) ou "BNaCI" (20) ou encore désigné ci-après "ASIC2A" ou "MDEG1" dont la séquence en acides aminés est représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID No : 3. MDEG a été décrit comme un canal cationique de mammifère sensible à l'amiloride qui est activé par des mutations responsables de neurodégénérescence avec les dégénérines de *C. elegans*. Le canal MDEG est un parent structural du canal ASIC, dont la séquence en acides

aminés présente environ 67% d'homologie avec la séquence du canal ionique MDEG. Toutefois, les propriétés électrophysiologiques de ces deux canaux sont différentes car ils ne sont pas activés par les mêmes changements de pH. Ainsi, la gamme de sensibilité de MDEG ($EC_{50} = 4,05$) est différente de celle de ASIC ($EC_{50} = 6,2$).

Il a été montré que le canal MDEG est activé par les mêmes mutations que celles causant une dégénérescence neuronale chez *C. elegans*. Ainsi, comme les mutants de dégénérine de *C. elegans* hyperactifs, les mutants actifs de MDEG sont responsables d'une mort cellulaire, indiquant que l'acquisition de fonction par ce canal ionique neuronal serait impliquée dans plusieurs formes de dégénérescence neuronale de mammifère et notamment humaine. Mais aucune fonction physiologique normale de MDEG n'était connue jusqu'à la mise en évidence de son activation par les protons conformément aux canaux cationiques de la présente invention.

D'autres exemples de protéines constituant un canal cationique neuronal sensible à l'amiloride et activé par les protons selon l'invention sont donnés ci-après :

- Un canal désigné ASIC1B dont la séquence de 559 acides aminés est représentée dans la liste de séquence en annexe sous le numéro SEQ ID NO : 4. ASIC1B est un variant dépissage du canal ASIC1A cloné à partir du cerveau de rat par PCR dégénérée. Les premier 185 amino acides sont remplacés par une nouvelle séquence de 218 amino acides qui est soulignée dans la SEQ ID NO : 4.

- Un canal désigné DRASIC dont la séquence de 533 acides aminés est représentée dans la liste de séquence en annexe sous le numéro SEQ ID NO : 5. DRASIC a été cloné à partir des neurones sensoriels de rat en utilisant une séquence partielle dans les banque de données ("Expressed Sequence Tag" avec le numéro

d'accession W62694). Les propriétés de DRASIC sont les suivantes :

-Il est exprimé dans les neurones sensoriels mais pas dans le cerveau.

5 - Son expression dans les oocytes de Xénope ou dans des cellules de mammifère permet d'enregistrer un courant sodium activé par le proton qui présente deux composantes : une composante s'activant et s'inactivant rapidement et une composante s'activant plus lentement et
10 ne s'inactivant pas. Les deux composantes sont sélectives pour le Na^+ . Un canal cationique activé par le proton et ne s'inactivant pas a été impliqué dans la sensation de douleur prolongée causée par une acidose.

15 L'invention concerne aussi un canal cationique hybride constitué de l'association d'une première protéine constituant un canal ionique activé par les protons selon l'invention avec une seconde protéine constituant un canal ionique activé par les protons.
20 Avantageusement, ladite seconde protéine est aussi une protéine constituant un canal ionique activé par les protons selon l'invention. A titre d'exemple d'une telle association, on peut citer l'association de la protéine du canal ASIC1A ou ASIC2A ou DRASIC avec la protéine du canal
25 MDEG1, permettant de former un canal hybride présentant une troisième gamme de sensibilité au pH (avec ASIC : $\text{EC}_{50} = 4,8$). Un autre exemple d'un tel canal hybride est l'association de la protéine des canaux ASIC1A, ASIC1B, MEDG1 ou DRASIC avec la protéine du canal MDEG2.

30 MDEG2 est un canal qui a été cloné à partir du cerveau de rat en utilisant une séquence partielle de souris accessible dans les banques de données ("Expressed Sequence Tag avec le numéro d'accession W50528") et dont la séquence de 563 acides aminés est représentée dans la
35 liste de séquence en annexe sous le numéro SEQ ID NO : 6.

MDEG2 est un variant d'épissage de MDEG1. Les premier 185 amino acides sont remplacés par une nouvelle séquence de 236 amino acides qui est soulignée dans la SEQ ID NO : 6. MDEG2 est exprimé dans le cerveau et dans les neurones sensoriels des ganglions de la racine dorsale.

MDEG2 exprimé seul dans les oocytes de Xénope ou dans des cellules de mammifères ne forme pas un canal cationique activé par le proton. Néanmoins, il peut s'associer avec MDEG1 ou DRASIC pour former des canaux hétéromultimériques activés par le proton avec des propriétés modifiées :

- Le pH d'activation du canal formé après la co-expression de MDEG1 et MDEG2 est différent. Après expression dans les cellules COS, le courant n'a pas atteint sa valeur maximale à pH 3 alors que le courant induit par MDEG1 seul sature à un pH compris entre 4,5 et 4,0.

- Les cinétiques d'inactivation et la sélectivité ionique du canal formé après la co-expression de MDEG1 et MDEG2 sont clairement différentes de celles de MDEG1 seul. Un courant s'inactivant lentement et peu sélectif pour le Na⁺ et le K⁺ apparaît.

- Le courant sodique soutenu obtenu après expression de DRASIC devient non sélectif (il ne différencie plus le sodium et le potassium) quand MDEG2 est co-exprimé avec DRASIC. Cette nouvelle propriété est similaire à celle du canal cationique activé par le proton qui a été impliqué dans la sensation de douleur prolongée causée par une acidose. Il est très probable que DRASIC et MDEG2 fassent partie de ce canal.

Les homologues de séquences en acides aminés des protéines constituant les canaux ASIC1A, ASIC1B, cités

selon l'invention sont données dans la tableau 1 ci-dessous.

Tableau 1

Canaux	ASIC 1B	ASIC 1A	MEDG2	MDEG1	DRASIC
ASIC1B	100	80	56	61	52
ASIC1A		100	59	68	53
MDEG2			100	78	48
MDEG1				100	51
DRASIC					100

5

Des anticorps poly ou monoclonaux dirigés contre au moins une protéine constituant un canal ionique de l'invention et/ou contre un canal hybride ci-dessus, peuvent être préparés par les méthodes classiques décrites dans la littérature. Ces anticorps sont utiles pour rechercher la présence des canaux ioniques de l'invention dans différents tissus humains ou animaux, mais ils peuvent aussi trouver des applications dans le domaine thérapeutique pour inhiber ou activer *in vivo*, grâce à leur spécificité, un canal ASIC et/ou ses dérivés.

15

La présente invention a aussi pour objet une molécule d'acide nucléique comprenant ou constituée par une séquence nucléique codant pour une protéine constituant un canal cationique neuronal sensible à l'amiloride et activé par les protons. Plus particulièrement l'invention concerne une molécule d'acide nucléique comprenant au moins une séquence codant pour la protéine constituant le canal ASIC dont la séquence en acides aminés est représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID No : 1 ou pour un dérivé fonctionnellement équivalent de cette protéine. Une molécule d'ADN comprenant la séquence codant pour la protéine ASIC est celle représentée dans la liste de

20

25

séquences en annexe sous le numéro SEQ ID NO:1 ou sa séquence complémentaire. Une autre molécule d'ADN selon l'invention est celle représentée dans la liste de séquence en annexe sous le numéro SEQ ID NO : 2 ou sous le
5 numéro SEQ ID NO : 3, ou leur séquence complémentaire.

Une molécule d'ADN comprenant la séquence codant pour la protéine ASIC1B est celle de 3647 pb représentée dans la liste de séquence en annexe sous le
numéro SEQ ID NO : 4 ou sa séquence complémentaire.

10 Une molécule d'ADN codant pour la protéine DRASIC est celle de 1602 pb représentée dans la liste de séquence en annexe sous le numéro SEQ ID NO : 5 ou sa séquence complémentaire.

15 Une molécule d'ADN comprenant la séquence codant pour la protéine MDEG2 est celle de 1602 pb représentée dans la liste de séquence en annexe sous le numéro SEQ ID NO : 6 ou sa séquence complémentaire.

L'invention concerne également un vecteur comprenant au moins une molécule d'acide nucléique
20 précédente, avantageusement associée à des séquences de contrôle adaptés, ainsi qu'un procédé de production ou d'expression dans un hôte cellulaire d'une protéine constituant un canal ionique selon l'invention. La préparation de ces vecteurs ainsi que la production ou
25 l'expression dans un hôte des canaux de l'invention peuvent être réalisées par les techniques de biologie moléculaire et de génie génétique bien connues de l'homme du métier.

30 A titre d'exemple, un procédé de production d'une protéine constituant un canal cationique selon l'invention consiste :

- à transférer une molécule d'acide nucléique de l'invention ou un vecteur contenant ladite molécule dans un hôte cellulaire,

- à cultiver ledit hôte cellulaire dans des conditions permettant la production de la protéine constituant le canal cationique,

5 - à isoler, par tous moyens appropriés les protéines constituant les canaux ioniques de l'invention.

A titre d'exemple, un procédé d'expression d'un canal ionique selon l'invention consiste :

10 - à transférer une molécule d'acide nucléique de l'invention ou un vecteur contenant ladite molécule dans une cellule,

- à cultiver ledit hôte cellulaire dans des conditions permettant l'expression de canaux ioniques de l'invention.

15 L'hôte cellulaire mis en oeuvre dans les procédés précédents peut être choisi parmi les procaryotes ou les eucaryotes et notamment parmi les bactéries, les levures, les cellules de mammifères, de plantes ou d'insectes.

20 Le vecteur utilisé est choisi en fonction de l'hôte dans lequel il sera transféré; il peut s'agit de tout vecteur comme un plasmide.

25 L'invention concerne donc aussi les cellules transformées exprimant les canaux ASIC et/ou ses dérivés comme MDEG obtenues conformément aux procédés précédents. Ces cellules sont utiles pour le criblage de substances capables de moduler la perception de l'acidité, tant en ce qui concerne la nociception que la transduction du goût. Ce criblage est effectué en mettant en contact des
30 quantités variables d'une substance à tester avec des cellules exprimant les canaux ASIC, puis en mesurant, par tous moyens appropriés, les effets éventuels de ladite substance sur les courants desdits canaux. Des techniques électrophysiologiques permettent également ces études et
35 font aussi l'objet de la présente invention dès lors

qu'elles mettent en oeuvre les canaux ASIC ou leurs dérivés. Ces criblages permettent d'identifier de nouveaux médicaments utiles dans le traitement ou la prévention de la douleur. Ils permettent également de rechercher des agents modulateurs du goût acide. En outre, ils permettent de rechercher des bloqueurs qui sont susceptibles d'inhiber des neurodégénérescences provoquées par hyperexpression de ces canaux. Ces médicaments, isolés et détectés grâce aux procédés ci-dessus, font également partie de l'invention. Les canaux ASIC ont en effet des propriétés de sélectivité ionique, notamment en ce qui concerne leur perméabilité sélective au sodium, potassium et calcium, qui les destinent à avoir des propriétés excitotoxiques lorsqu'ils sont hyperstimulés.

Une protéine constituant un canal ionique neuronal ASIC peut être aussi utile pour la fabrication de médicaments destinés à traiter ou prévenir des pathologies impliquant la perception douloureuse de l'acidité qui intervient dans les maladies inflammatoires, les ischémies et dans un certain nombre de tumeurs. L'invention concerne donc aussi les compositions pharmaceutiques comprenant comme principe actif au moins une protéine constituant un canal ionique selon l'invention.

Une molécule d'acide nucléique codant pour une protéine constituant un canal ASIC ou un dérivé de celui-ci, ou un vecteur comprenant cette molécule d'acide nucléique ou encore une cellule exprimant des canaux ASIC, sont aussi utiles pour la préparation d'animaux transgéniques. Il peut s'agir d'animaux sur-exprimant lesdits canaux, mais surtout d'animaux dit "knock out", c'est à dire présentant une déficience en ces canaux; ces animaux transgéniques sont préparés par des méthodes connues de l'homme du métier, et permettent de disposer de modèles vivants pour l'étude de pathologies animales associées aux canaux ASIC.

Les molécules d'acide nucléique de l'invention ou les cellules transformées par ladite molécule sont donc susceptibles d'être utilisées dans des stratégies de thérapie génique afin de compenser une

5 déficience des canaux ASIC au niveau de un ou plusieurs tissus d'un patient. L'invention concerne donc aussi un médicament comprenant des molécules d'acide nucléique de l'invention ou de cellules transformées par lesdites molécules pour le traitement de pathologie impliquant les

10 canaux ASIC et leurs dérivés.

Outre la propriété d'être activé par les protons et les applications décrites ci-dessus qui en résultent dans le domaine de la perception de l'acidité,

15 le canal ASIC, du fait de sa parenté structurale avec le canal MDEG, est susceptible de se comporter comme une dégénérine neuronale à la suite de mutation.

La mort de certains neurones est caractéristique de plusieurs types de dégénérescences

20 neuronales telles que les maladies d'Alzheimer, d'Huntington, de Parkinson, la sclérose latérale amyotrophique, l'ataxie cérébelleuse. Seuls quelques gènes déficients sont connus et plusieurs restent encore à identifier. Le réseau neuronal primitif du nématode *C. elegans* constitue un bon modèle du développement et de la

25 mort neuronal. La dégénérescence héréditaire chez *C. elegans* peut être due à des mutations des dégénérines deg-1, mec-4 et mec 10. Les homologies avec les sous-unités du canal sodium sensible à l'amiloride, le produit

30 d'expression fonctionnel des chimères mec-4 du canal sodium épithélial, suggèrent que les dégénérines sont des canaux ioniques dont l'acquisition de fonction est la cause de dégénérescence neuronale.

La présente invention concerne donc aussi

35 les applications du canal ASIC pour l'étude de ces

modifications pathologiques susceptibles de conduire à des dégénérescences. Les techniques mises en oeuvre pour ces applications, par exemple pour le criblage de drogues, sont similaires à celles décrites précédemment pour la recherche d'agents modulateurs du goût ou d'analgésiques.

En outre, une protéine constituant un canal ionique neuronal ASIC, un agoniste ou un antagoniste de celle-ci, peuvent être aussi utiles pour la fabrication de médicaments destinés à traiter ou prévenir des pathologies impliquant une dégénérescence neuronale cérébrale. L'invention concerne donc aussi les compositions pharmaceutiques comprenant comme principe actif au moins une de ces protéines éventuellement associée à un véhicule physiologiquement acceptable.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront dans la description qui suit se rapportant aux travaux de recherche ayant mené à la mise en évidence et à la caractérisation du canal ASIC, et dans laquelle il sera fait référence aux séquences et dessins en annexe dans lesquels :

- SEQ ID NO : 1 représente la séquence de 526 acides aminés de la protéine du canal ASIC déduite de la séquence de l'ADNc de rat.

- SEQ ID NO : 2 représente la séquence partielle de 514 acides aminés de la protéine du canal ASIC déduite de la séquence partielle de l'ADNc humain.

- SEQ ID NO : 3 représente la séquence de 512 acides aminés de la protéine du canal MDEG déduite de la séquence de l'ADNc humain.

-SEQ ID NO : 4 représente la séquence de 559 acides aminés de la protéine du canal ASIC1B ainsi que la séquence d'une molécule d'ADN comprenant la séquence codant pour cette protéine.

-SEQ ID NO : 5 représente la séquence de 533 acides aminés de la protéine du canal DRASIC et la séquence d'ADN codant pour cette protéine.

5 -SEQ ID NO : 6 représente la séquence de 563 acides aminés de la protéine du canal MDEG2 ainsi que la séquence d'une molécule d'ADN comprenant la séquence codant pour cette protéine.

10 - La figure 1 représente l'alignement des séquences des protéines ASIC de rat (en haut) et humain (en bas) des séquences SEQ ID NO : 1 et SEQ ID NO : 2. La comparaison de ces séquences fait apparaître l'absence de 14 acides aminés au début de la phase codante humains par rapport à celle du rat.

15 La figure 2 représente la comparaison de la séquence de la protéine du canal ASIC avec la séquence d'autres canaux ioniques :

- MDEG (14), un canal cationique de mammifère qui est activé par des mutations responsables de neurodégérescences avec les dégénérines de *C. elegans*.

20 - FaNaCh (10), un peptide d'un canal sodium de *Helix aspersa* qui est activé par la FMRFamide.

- La dégénérine MEC-4 (12) de *C. elegans*.

25 Dans cette figure, les résidus identiques ou similaires à ceux de ASIC sont imprimés respectivement en blanc sur fond noir et en noir sur fond gris. Les régions supposées transmembranaires (MI, MII) d'ASIC sont marquées par des barres noires.

30 La figure 3 représente l'arbre phylogénétique des protéines des sous unités α NaCh, β NaCh, γ NaCh, δ NaCh du canal sodium sensible à l'amiloride et des dégénérines MEC-4, MEC-10 et DEG-1 de *C. elegans*.

La figure 4 représente la topologie qui est proposée pour cette dernière famille de canaux ioniques (30).

La figure 5 montre les propriétés biophysiques du canal ASIC1 activé par les protons.

- En a : les courants macroscopiques entrant enregistrés à -70 mV après des rapides changements du pH de pH 7,4 à pH 6.

- En b : La courbe dose réponse du pH extracellulaire. Le pH initial était de 7,4 et les points représentent les valeurs moyennes de 6 expériences. L'encart dans cette figure montre les réponses typiques à -70 mV.

- En c : les relations Q-V des patch "outside-out" avec 140 mM de Na⁺(■) ou de Li⁺(•) dans la solution du bain. Q est la charge transportée durant la transition de pH acide. L'encart dans cette figure montre les réponses typiques dans un milieu contenant du Na⁺.

- En d : les courants activés par les protons H⁺ enregistrés à différents potentiels dans un patch "outside-out" dans un milieu contenant du Na⁺.

- En e : les relations moyennes i-V mesurées à partir de patch "outside-out" avec 140 mM de Na⁺(■), 140 mM de Li⁺(•) ou 1,8 mM de Ca²⁺ (Δ), en tant qu'ions perméables majoritaires dans les solutions externes ; les potentiels d'inversion étaient respectivement de 65 mV, 58 mV et -34 mV.

- En f : le courant de protons à travers le canal ASIC1. Les relations entre le pic de courant et le voltage ont été mesurées à partir de patch "outside-out" dans une solution de Na⁺ libre, Ca²⁺ libre avec des pipettes contenant une solution de K⁺ libre, à pH 4 (•) et à pH 3 (■). (Δ) représentent les résultats obtenus dans les mêmes conditions que (■) mais avec du KCl dans la pipette. L'encart dans cette figure montre les réponses typiques enregistrées dans les conditions (Δ).

La figure 6 montre l'effet du Ca²⁺ et de l'amiloride sur le courant ASIC.

- En a : les courants activés par les protons H^+ enregistrés à différents potentiels membranaires à partir d'un patch outside-out avec 1,8 mM de Ca^{2+} dans une solution de Na^+ libre ; les courants se sont inversés à -35 mV.

- En b : Les relations Q-V moyennes à partir d'un patch outside-out enregistrées dans des solutions de Na^+ libre contenant 1,8 mM de Ca^{2+} (o, potentiel d'inversion -34 mV) ou 0,1 mM de Ca^{2+} (., potentiel d'inversion -80 mV).

- En c : L'effet du Ca^{2+} externe sur le pic macroscopique de courant entrant enregistré à -70 mV et activé par un changement rapide de pH de pH 7,4 à pH 6. L'encart dans cette figure montre les réponses typiques. Les points représentent les valeurs moyennes \pm se de 5 oocytes.

- En d : L'effet de l'amiloride sur les courants activés par les protons H^+ enregistré à 0 mV à partir d'un patch outside-out.

- En e : L'inhibition du courant macroscopique (induit par un changement de pH de pH 7,4 à pH 6) à -70 mV par l'amiloride et dérivés. Les points représentent les valeurs moyennes \pm se de 5 oocytes.

La figure 7 montre la distribution tissulaire de l'ARNm du canal ASIC.

- En a : L'analyse en Northern blot de l'expression ARNm du canal ASIC dans des tissus humains.

- En b : L'analyse en RT-PCR de l'expression de l'ARNm du canal ASIC dans le cerveau de rat et dans le ganglion de la racine dorsale (DRG). (+), (-) représentent respectivement les échantillons avec ou sans reverse transcriptase. Des sections d'un gel d'agarose révélé au bromure d'éthidium 1%. Les flèches indiquent la taille escomptée (657 pb) du produit de PCR.

La figure 8 représente l'hybridation *in situ*.

- En a et b : L'hybridation de sections de 6 μ m d'un ganglion de la racine dorsale d'un rat agé de 3 mois avec la sonde E marquée à la digoxigénine. En a : Une microphotographie à faible pouvoir éclairant (grossissement de 30 fois). En b : Une image à haute résolution (grossissement de 80 fois) de a. On note le marquage intense des neurones de petit diamètre (flèches). Des résultats similaires ont aussi été obtenus avec les sondes A, C et D.

- En c : La distribution de l'ARNm du canal ASIC dans le cerveau d'un rat adulte analysée par hybridation *in situ* avec l'oligonucléotide antisens C. Des résultats identiques ont été obtenus avec l'oligonucléotide B. Les couleurs indiquent l'abondance (rouge : haute expression ; bleu : non détectable). Les abréviations utilisées dans la figure sont les suivantes : Cer = Cerebellum ; Hip = Hypocampe ; OB = Bulbe olfactif ; Cx = Cortex.

I - Matériels et Méthodes.

1) Clonage du canal ASIC.

Les séquences conservées de la famille de canaux ioniques ASIC ont été utilisées pour préparer les amorces PCR de séquences suivantes :

TTYCCIGCIRTIACIIITNTGYAAY, et

CAIARICCIAIITGNCCNCCDAWRTC.

Une banque d'ADNc de cerveau de rat (Stratagène #936515) a été hybridée avec le produit de PCR de 1 kB de cerveau de rat et des clones partiels ont été isolés. L'extrémité 5' de l'ADNc (202 bp) a été isolée par PCR après une ligation adaptée à l'ADNc double brin.

2) Electrophysiologie.

0,25 ng d'ARNc a été injecté dans des oocytes de *Xenopus laevis* et les microélectrodes d'enregistrement pour le voltage imposé et pour le patch-clamp ont été mises en place deux jours après l'injection. Les solutions de bains pour les enregistrements de patch outside-out et les pipettes pour les enregistrements de patch outside-out et de cellules totales, contenaient : 140 mM KCl (ou NMDG), 2 mM MgCl₂, 5 mM EGTA, 10 mM Hepes, pH 7,4 (avec KOH). Les pipettes pour les enregistrements de patch outside-out et les solutions de bains pour les enregistrements de patch outside-out et de cellules totales, contenaient : 140 mM NaCl (ou LiCl ou NMDGCl), 2 mM MgCl₂, 1,8 mM CaCl₂, 10 mM Hepes, pH 7,4 (ajusté avec HCl, NaOH, LiOH ou TMAOH). Les changements rapides de pH depuis le pH initial ont été obtenus par perfusion avec une solution de bain ajustée aux pH indiqués dans les figures. L'acidification intracellulaire des oocytes a été réalisée en injectant 50 nl de la solution interne à pH2 ou par perfusion et retrait d'un milieu de bain contenant 20 mM NH₄Cl. Aucun des courants enregistrés n'était contaminé par le courant Ca²⁺ sensible au Cl⁻ de l'oocyte de *Xenopus*. Les données ont été échantillonnées à 2 kHz et filtrées à 500 Hz pour l'analyse (Logiciel Biopatch).

3) Analyse Northern Blot, RT-PCR et hybridation in situ.

Le Northern blot a été obtenu auprès de la Société Clontech (Palo Alto, Ca) et contenait environ 2 µg d'ARN poly(A+) par ligne. Le blot a été hybridé avec un fragment du clone partiel humain (correspondant aux bases 270 à 764 du clone de rat) marqué au ³²P, à 65°C dans 6xSSC. Pour l'analyse RT-PCR, 5 µg de l'ARN total de cerveau de rat et 3 µg de ganglion de la racine dorsale ont été reverse transcrits et 1/30 de l'échantillon a été

amplifié par 30 cycles de PCR avec les amorces de séquences ci-dessous :

ATTGCTCTTCCCATCTCTAT, et

TTCAAGGCCCATACCTAAGT.

5 Les contrôles négatifs ont été traités de façon identique, à l'exception de la reverse transcriptase qui n'a pas été ajoutée. Les oligonucléotides antisens correspondant aux base 70 à 114 (A), 215 à 248 (B), 1821 à 1859 (C), 1896 à 1940 (D) et l'ADN double brin
10 correspondant aux base 1685 à 2672 ont été utilisés pour les hybridations *in situ*. Les sections de cerveau de rat adulte ont été hybridées avec les oligonucléotides B ou C dont l'extrémité était marquée au ^{32}P , pour une nuit à 37°C dans 50% formamide, 2xSSC, puis lavées à température
15 ambiante dans 1xSSC. Le signal a été aboli par un excès 500 fois d'oligonucléotides non marqués. Les sections de ganglion de la racine dorsale ont été hybridées avec les oligonucléotides A, C ou D marqués par la digoxigénine (DIG)-dUTP et avec la sonde E marquée par DIG-
20 d-UTP par PCR. Le marquage des sondes, la préparation des échantillons, l'hybridation et la visualisation des acides nucléiques DIG avec la phosphatase alcaline conjuguée à des anticorps anti-DIG ont été réalisés conformément aux protocoles du fournisseur (Boehringer Mannheim).

25

4) Analyse informatique.

L'alignement de séquences et l'arbre phylogénétique (substitution Kimura, option UPGMA) ont été réalisés avec le logiciel GCG (Genetics Computer Group,
30 Madison WI).

II - Résultats.

35 L'ADNc de 35 kb isolé de cerveau de rat code pour une protéine de 526 acides aminés qui présente, comme

montré sur la figure 2, des homologues avec tous les membres clonés de la famille des canaux sodium de dégénérine sensibles à l'amiloride.

Comme montré sur la figure 5, l'expression de l'ARNc dans des oocytes de *Xenopus* a induit un courant entrant activé par les protons H^+ . Les propriétés biophysiques et la pharmacologie du canal ASIC sont proches de celles décrites pour les canaux cationiques activés par les protons des neurones sensoriels (3, 15, 16). Une baisse du pH extracellulaire au dessous d'un pH de 6,9 active un courant entrant rapidement élevé et désensibilisé (figure 5 a et b). Ce canal est activé par les protons extracellulaires, puisque, comme montré sur la figure 5 (c et d), l'application d'un acide sur la face extracellulaire de patch outside-out active le canal. L'acidification intracellulaire d'oocytes et l'acidification de la face intracellulaire de patch outside-out n'active pas le canal ASIC ni n'altère le courant ASIC induit par les protons extracellulaires.

L'analyse des courbes I-V de la figure 5 (c et e) enregistrées avec différents cations extracellulaires montre que Na^+ est l'ion perméable majoritaire (canal de conductance simple 14,3 pS). Comme le canal ionique sensible aux protons des neurones sensoriels (15, 16), le canal ASIC discrimine faiblement entre les cations (figure 5 c, e, f). En effet, le canal est aussi perméable à Li^+ , K^+ , Ca^{2+} et H^+ , avec des rapports $pNa^+/pLi^+ = 1,3$ (figure 5 c, e), $pNa^+/pK^+ = 13$ (figure 5 c, e), $pNa^+/Ca^{2+} = 2,5$ (figure 5 e) et $pNa^+/H^+ = 0,8$ (figure 5 f). La perméabilité au Ca^{2+} de ASIC pourrait être un chemin d'entrée voltage indépendant de Ca^{2+} dans la cellule. Un courant entrant de Ca^{2+} dans la cellule à travers les canaux ASIC peut être détecté en l'absence de Na^+ extracellulaire (figure 6 a, b). Comme indiqué sur la figure 5 (e) la conductance unitaire pour Ca^{2+} était de

5,2 pS. En présence de 140 mM de Na^+ extracellulaire, l'augmentation des concentrations en Ca^{2+} externe, a diminué l'amplitude du courant activé par les protons (figure 6c), démontrant ainsi que Ca^{2+} inhibe la perméabilité au Na^+ . Un blocage par le Ca^{2+} externe est caractéristique du $\text{I}(\text{H}^+)$ des neurones sensoriels (17). Le courant entrant activé par H^+ dans les neurones sensoriels est inhibé par l'amiloride (18) et l'éthylisopropylamiloride (EIPA) (19). Comme montré à la figure 6 (d, e) le canal ASIC présente la même pharmacologie et est bloqué de façon réversible ($K_d = 10 \mu\text{M}$) par l'amiloride et ses dérivés benzamil et EIPA.

Par ailleurs, la protéine du canal ASIC présente environ 67% d'homologie de séquences avec le canal ionique de dégénéérine dénommé "MDEG" (14) ou "BNaCl" (20). Toutefois, les propriétés électrophysiologiques de ces deux clones exprimés dans les oocytes de *Xenopus* sont clairement différentes :

- Comme montré sur la figure 5a, le canal MDEG n'est pas activé par les mêmes changements de pH que le canal ASIC.

- La substitution du résidu glycine en position 430 de MDEG par un acide aminé encombrant acide, comme la valine ou la phénylalanine active le canal (14), tout comme la mutation de l'alanine en position 704 de la dégénéérine MEC-4 cause une neurodégénérescence chez *C. elegans* (12). Des mutations identiques d'ASIC (glycine en position 431 remplacée par la valine ou la phénylalanine) n'entraînent pas d'activité et les mutants ne peuvent pas être activés par les protons.

Les canaux cationiques activés par les protons ont été décrits dans les neurones sensoriels mais aussi dans les neurones du système nerveux central (21). La distribution tissulaire de l'expression de l'ARNm du canal ASIC est en accord avec cette observation. Comme

rapporté dans la figure 7a, un transcrit de 4,3 kb a été détecté dans le cerveau par analyse en Northern blot, et les résultats de la RT-PCR rapportés à la figure 7b montrent que le ganglion de la racine dorsale exprime l'ARNm de ASIC. La figure 8 (a,b) montre que l'ARNm de ASIC est bien exprimé dans les petits neurones du ganglion de la racine dorsale, ce qui supporte le fait que ASIC est le canal cationique activé par les protons rapidement désensibilisant décrit dans les neurones sensoriels nociceptifs. Alors que la présence de canaux cationiques activés par les protons dans le ganglion de la racine dorsale est en accord avec leur fonction de détecteur de l'acidité dans la nociception, leur rôle dans le cerveau reste à établir. Les résultats d'hybridation *in situ* de la figure 8c montrent une expression large et hétérogène de l'ARNm du canal ASIC. Les niveaux d'expression les plus élevés ont été observés dans le bulbe olfactif principal, le cortex cérébral, l'hippocampe, l'habenula, le noyau amygdaloïde basolatéral et le cerebellum. L'activité synaptique s'accompagne de changements du pH extracellulaire (22, 23) et les changements localisés rapides de pH dans ou à proximité de la fente synaptique sont sensiblement plus saturés et forts que les fluctuations macroscopiques du pH rapportées.

Les canaux cationiques activés par les protons sont les seuls canaux ioniques connus qui sont directement activés par un changement du pH et il a été envisagé que les fluctuations extracellulaires du pH jouent un rôle neuromodulateur (23). L'expression de canaux cationiques dans le cerveau supporte en outre l'hypothèse que les fluctuations de pH ne sont pas seulement une activation neuronale par un produit, mais davantage un chemin de communication dans le système nerveux central.

Outre les canaux cationiques activés par les protons rapidement inactivés, il a été rapporté la présence dans les neurones sensoriels de canaux cationiques activés par les protons présentant des cinétiques plus lentes (4, 24). Les canaux cationiques activés par les protons forment probablement, comme d'autre canaux cationiques activés par un ligand (25, 26), une famille de canaux cationiques où différentes sous-unités ou combinaisons de sous-unités constituent les canaux avec diverses propriétés pharmacologiques et biophysiques.

La sensation de l'acidité n'est pas uniquement impliquée dans la nociception, mais est aussi associée à la transduction du goût (2). Les stimulations acides activent les canaux cationiques activés par les protons dans les cellules du goût (2, 27) et l'amiloride inhibe la perception du goût acide (2). Aussi, les données tant physiologiques que pharmacologiques indiquent que ASIC et d'autres membres de cette famille sont impliqués dans la transduction du goût. Il est en effet particulièrement frappant que la même classe de canaux ioniques soit associée à différentes facettes de la perception sensorielle :

- Les canaux sodium sensibles à l'amiloride sont associés à la transduction du goût salé (2).

- Les dégénérines de *C. elegans* sont impliquées dans la mécanotransduction et ont été proposées comme formant des canaux ioniques mécanosensibles (28, 29).

- les canaux ASIC sont impliqués dans la nociception et dans la transduction du goût acide.

Le clonage du canal ASIC permet de disposer d'un nouvel outil d'investigation de ce groupe de canaux ioniques et de développer des bloquants spécifiques trouvant leur utilisation notamment comme analgésiques.

Liste des références

1. Rang, H.P., Bevan, S. & Dray, A. *Br. Med. Bull.* 47, 534-548 (1991).
2. Lindemann, B. *Physiol. Rev.* 76, 718-766 (1996).
3. Krishtal, O.A. & Pidoplichko, V.I. *Neuroscience* 6, 2599-2601 (1981).
4. Bevan, S. & Geppetti, P. *Trends Neurosci.* 17, 509-512 (1994).
5. Akaike, N., Krishtal, O.A. & Maruyama, T. *J. Neurophysiol.* 63, 805-813 (1990).
6. Canessa, C.M., Horisberger, J.D. & Rossier, B.C. *Nature* 361, 467-470 (1993).
7. Canessa, C.M., Schild, L., Buell, G., Thorens, B., Gautschi, I., Horisberger, J.D. & Rossier, B.C. *Nature* 367, 463-467 (1994).
8. Lingueglia, E., Voilley, N., Waldmann, R., Lazdunski, M. & Barbry, P. *Febs Lett.* 318, 95-99 (1993).
9. Lingueglia, E., Renard, S., Waldmann, R., Voilley, N., Champigny, G., Plass, H., Lazdunski, M. & Barbry, P. *J. Biol. Chem.* 269, 13736-13739 (1994).
10. Lingueglia, E., Champigny, G., Lazdunski, M. & Barbry, P. *Nature* 378, 730-733 (1995).
11. Waldmann, R., Champigny, G., Bassilana, F., Voilley, N. & Lazdunski, M. *J. Biol. Chem.* 270, 27411-27414 (1995).
12. Driscoll, M. & Chalfie, M. *Nature* 349, 588-593 (1991).
13. Huang, M. & Chalfie, M. *Nature* 367, 467-470 (1994).
14. Waldmann, R., Champigny, G., Voilley, N., Lauritzen, I. & Lazdunski, M. *J. Biol. Chem.* 271, 10433-10434 (1996).
15. Kovalchuk Yu, N., Krishtal, O.A. & Nowycky, M.C. *Neurosci. Lett.* 115, 237-242 (1990).
16. Konnerth, A., Lux, H.D. & Morad, M. *J. Physiol.* 386, 603-633 (1987).
17. Davies, N.W., Lux, H.D. & Morad, M. *J. Physiol.* 400, 159-187 (1988).
18. Korkushko, A. O. & Krishtal, O.A. *Neirofiziologiya* 16, 557-561 (1984).
19. Grantyn, R., Perouansky, M., Rodriguez-Tebar, A. & Lux, H.D. *Dev. Brain Res.* 49, 150-155 (1989).

20. Price, M.P., Snyder, P.M. & Welsh, M.J. *J. Biol. Chem.* 271, 7879-7882 (1996).
21. Akaike, N. & Ueno, S. *Prog. Neurobiol.* 43, 73-83 (1994).
22. Krishtal, O.A., Osipchuk, Y.V., Shelest, T.N. & Smirnoff, S.V. *Brain Res.* 436, 352-356 (1987).
23. Chesler, M. & Kaila, K. *Trends Neurosci.* 15, 396-402 (1992).
24. Bevan, S. & Yeats, J. *J. Physiol.* 433, 145-161 (1991).
25. Lewis, C., Neidhart, S., Holy, C., North, R. A., Buell, G. & Surprenant, A. *Nature* 377, 432-435 (1995).
26. Barnard, E.A. *Trends Pharmacol. Sci.* 17, 305 - 309 (1996).
27. Okada, Y., Miyamoto, T. & Sato, T. *J. Exp. Biol.* 187, 19-32 (1994).
28. Liu, J., Schrank, B. & Waterston, R. *Science* 273, 361 (1996).
29. Waldmann, R., Champigny, G. & Lazdunski, M. *J. Biol. Chem.* 270, 11735-11737 (1995).
30. Renard, S., Lingueglia, E., Voilley, N., Lazdunski, M. & Barbry, P. *J. Biol. Chem.* 269, 12981-12986 (1994).

LISTE DE SÉQUENCES.

NOMBRE DE SÉQUENCES : 6

5 INFORMATION CONCERNANT LA SEQ ID NO:1 :

i) CARACTERISTIQUE DE LA SEQUENCE :

A) LONGUEUR : 3562 paires de base

B) TYPE : acide nucléique

10 C) NOMBRE DE BRINS : double

D) CONFIGURATION : linéaire

ii) TYPE DE MOLECULE : ADN

vi) ORIGINE : rat

15

ix) CARACTERISTIQUE

A) NOM/CLE : ASIC

B) LOCALISATION : 123 .. 1700

20 xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID NO:1 :

CACACACACA CACACACACA CACACACACA CACACACACA CACACAGAAC CTGCGCCTGT 60

GCCTGTGCCT GTGCCTGTGC CTGTTTGAGA GCTGGAGACA CAGAAGGATC CCCTTGCCAA 120

25

GG ATG GAA TTG AAG ACC GAG GAG GAG GAG GTG GGT GGT GTC CAG CCG 167

Met Glu Leu Lys Thr Glu Glu Glu Glu Val Gly Gly Val Gln Pro

1

5

10

15

30

GTG AGC ATC CAG GCT TTC GCC AGC AGC TCC ACG CTG CAT GGT CTT GCC 215

Val Ser Ile Gln Ala Phe Ala Ser Ser Ser Thr Leu His Gly Leu Ala

20

25

30

35

CAC ATC TTC TCC TAT GAG CGG CTG TCT CTG AAG CGG GCA CTG TGG GCC 263

His Ile Phe Ser Tyr Glu Arg Leu Ser Leu Lys Arg Ala Leu Trp Ala

35

40

45

40

CTG TGC TTC CTG GGT TCG CTG GCC GTC CTG CTG TGT GTG TGC ACT GAG 311

Leu Cys Phe Leu Gly Ser Leu Ala Val Leu Leu Cys Val Cys Thr Glu

50

55

60

45

CGT GTG CAG TAC TAC TTC TGC TAT CAC CAC GTC ACC AAG CTT GAC GAA 359

Arg Val Gln Tyr Tyr Phe Cys Tyr His His Val Thr Lys Leu Asp Glu

65

70

75

50

GTG GCT GCC TCC CAG CTC ACC TTC CCT GCT GTC ACA CTG TGC AAT CTC 407

Val Ala Ala Ser Gln Leu Thr Phe Pro Ala Val Thr Leu Cys Asn Leu

80

85

90

95

50

AAT GAG TTC CGC TTT AGC CAA GTC TCC AAG AAT GAC CTG TAC CAT GCT 455

Asn Glu Phe Arg Phe Ser Gln Val Ser Lys Asn Asp Leu Tyr His Ala

100

105

110

	GGG GAG CTG CTG GCC CTG CTC AAC AAC AGG TAT GAG ATC CCG GAC ACA	503
	Gly Glu Leu Leu Ala Leu Leu Asn Asn Arg Tyr Glu Ile Pro Asp Thr	
	115 120 125	
5	CAG ATG GCT GAT GAA AAG CAG CTA GAG ATA TTG CAG GAC AAG GCC AAC	551
	Gln Met Ala Asp Glu Lys Gln Leu Glu Ile Leu Gln Asp Lys Ala Asn	
	130 135 140	
10	TTC CGG AGC TTC AAG CCC AAG CCC TTC AAC ATG CGT GAA TTC TAC GAC	599
	Phe Arg Ser Phe Lys Pro Lys Pro Phe Asn Met Arg Glu Phe Tyr Asp	
	145 150 155	
15	AGA GCG GGG CAC GAT ATT CGA GAC ATG CTG CTC TCG TGC CAC TTC CGT	647
	Arg Ala Gly His Asp Ile Arg Asp Met Leu Leu Ser Cys His Phe Arg	
	160 165 170 175	
20	GGG GAG GCC TGC AGC GCT GAA GAT TTC AAA GTG GTC TTC ACT CGG TAT	695
	Gly Glu Ala Cys Ser Ala Glu Asp Phe Lys Val Val Phe Thr Arg Tyr	
	180 185 190	
25	GGG AAG TGT TAC ACA TTC AAC TCG GGC CAA GAT GGG CGG CCA CGG CTG	743
	Gly Lys Cys Tyr Thr Phe Asn Ser Gly Gln Asp Gly Arg Pro Arg Leu	
	195 200 205	
30	AAG ACC ATG AAA GGT GGG ACT GGC AAT GGC CTG GAG ATC ATG CTG GAC	791
	Lys Thr Met Lys Gly Gly Thr Gly Asn Gly Leu Glu Ile Met Leu Asp	
	210 215 220	
35	ATT CAG CAA GAT GAA TAT TTG CCT GTG TGG GGA GAG ACC GAC GAG ACA	839
	Ile Gln Gln Asp Glu Tyr Leu Pro Val Trp Gly Glu Thr Asp Glu Thr	
	225 230 235	
40	TCC TTC GAA GCA GGC ATC AAA GTG CAG ATC CAC AGT CAG GAT GAA CCC	887
	Ser Phe Glu Ala Gly Ile Lys Val Gln Ile His Ser Gln Asp Glu Pro	
	240 245 250 255	
45	CCT TTC ATC GAC CAG CTG GGC TTT GGT GTG GCT CCA GGT TTC CAG ACG	935
	Pro Phe Ile Asp Gln Leu Gly Phe Gly Val Ala Pro Gly Phe Gln Thr	
	260 265 270	
50	TTT GTG TCT TGC CAG GAG CAG AGG CTC ATC TAC CTG CCC TCA CCC TGG	983
	Phe Val Ser Cys Gln Glu Gln Arg Leu Ile Tyr Leu Pro Ser Pro Trp	
	275 280 285	
55	GGC ACC TGC AAT GCT GTT ACC ATG GAC TCG GAT TTC TTC GAC TCC TAC	1031
	Gly Thr Cys Asn Ala Val Thr Met Asp Ser Asp Phe Phe Asp Ser Tyr	
	290 295 300	
55	AGC ATC ACT GCC TGC CGG ATT GAT TGC GAG ACG CGT TAC CTG GTG GAG	1079
	Ser Ile Thr Ala Cys Arg Ile Asp Cys Glu Thr Arg Tyr Leu Val Glu	
	305 310 315	
55	AAC TGC AAC TGC CGT ATG GTG CAC ATG CCA GGG GAC GCC CCA TAC TGC	1127
	Asn Cys Asn Cys Arg Met Val His Met Pro Gly Asp Ala Pro Tyr Cys	
	320 325 330 335	

	ACT CCA GAG CAG TAC AAG GAG TGT GCA GAT CCT GCC CTG GAC TTC CTA	1175
	Thr Pro Glu Gln Tyr Lys Glu Cys Ala Asp Pro Ala Leu Asp Phe Leu	
	340 345 350	
5	GTG GAG AAA GAC CAG GAA TAC TGC GTG TGT GAG ATG CCT TGC AAC CTG	1223
	Val Glu Lys Asp Gln Glu Tyr Cys Val Cys Glu Met Pro Cys Asn Leu	
	355 360 365	
10	ACC CGC TAC GGC AAG GAG CTG TCC ATG GTC AAG ATC CCA AGC AAA GCC	1271
	Thr Arg Tyr Gly Lys Glu Leu Ser Met Val Lys Ile Pro Ser Lys Ala	
	370 375 380	
15	TCC GCC AAG TAC CTG GCC AAG AAG TTC AAC AAA TCG GAG CAG TAC ATA	1319
	Ser Ala Lys Tyr Leu Ala Lys Lys Phe Asn Lys Ser Glu Gln Tyr Ile	
	385 390 395	
20	GGG GAG AAC ATT CTG GTG CTG GAC ATT TTC TTT GAA GTC CTC AAC TAT	1367
	Gly Glu Asn Ile Leu Val Leu Asp Ile Phe Phe Glu Val Leu Asn Tyr	
	400 405 410 415	
	GAG ACC ATC GAG CAG AAA AAG GCC TAT GAG ATC GCA GGG CTG TTG GGT	1415
	Glu Thr Ile Glu Gln Lys Lys Ala Tyr Glu Ile Ala Gly Leu Leu Gly	
	420 425 430	
25	GAC ATC GGG GGC CAG ATG GGG TTG TTC ATC GGT GCC AGC ATC CTC ACC	1463
	Asp Ile Gly Gly Gln Met Gly Leu Phe Ile Gly Ala Ser Ile Leu Thr	
	435 440 445	
30	GTG CTG GAA CTC TTT GAC TAT GCC TAC GAG GTC ATT AAG CAC AGG CTG	1511
	Val Leu Glu Leu Phe Asp Tyr Ala Tyr Glu Val Ile Lys His Arg Leu	
	450 455 460	
35	TGC AGA CGT GGA AAG TGC CAG AAG GAG GCT AAG AGG AGC AGC GCA GAC	1559
	Cys Arg Arg Gly Lys Cys Gln Lys Glu Ala Lys Arg Ser Ser Ala Asp	
	465 470 475	
40	AAG GGC GTG GCG CTC AGC CTG GAT GAC GTC AAA AGA CAC AAT CCC TGC	1607
	Lys Gly Val Ala Leu Ser Leu Asp Asp Val Lys Arg His Asn Pro Cys	
	480 485 490 495	
	GAG AGC CTC CGA GGA CAT CCT GCC GGG ATG ACG TAC GCT GCC AAC ATC	1655
	Glu Ser Leu Arg Gly His Pro Ala Gly Met Thr Tyr Ala Ala Asn Ile	
	500 505 510	
45	CTA CCT CAC CAT CCC GCT CGA GGC ACG TTT GAG GAC TTT ACC TGC TAA	1703
	Leu Pro His His Pro Ala Arg Gly Thr Phe Glu Asp Phe Thr Cys *	
	515 520 526	
50	GCCCTCGCAG GCCGCTGTAC CAAAGGCCTA GGTGGGGAGG GCTGGGGGAG CAAGGGGCCC	1763
	CCAACTGCCC CCAGCTACCC TGTGGACTTA ACTGCATTCC TGGTCAGTGG TTCCCTCTTG	1823
	TCTGTGGTGA GAAAGGAGTC TTGACCATAG AGTCCTCTCC CAGCCTCTAT CCCATCTTTT	1943
55	TATTTTAATT TAATCACATT TGCTCTGTAA TATTGCTTGA GGCTGGGGAT CGTGATTTC	2003
	CCCCAGTTCT TTTATTGTTG AGAATAGTTT TCTCTATTCT GGGTTTTCTG TTATTTCAAA	2063

	TGAATCTGCA	AATTGCTCTT	CCCATCTCTA	TGAAGAATTG	CGTTGGAATT	TTGATGGGGA	2123
	TTGTATTGAA	TCTGTAGATT	GCCTTTGGTA	AGATGGCCAT	TTTTACTATG	TTAATCCTGC	2183
5	CAATTCATGA	GCAAGGGAGA	TCTTTCATC	TCTGAAATCT	ACTTCAGTTT	CTTCTTCAG	2243
	AGACTTGAAG	TTCTTGTCT	AAAAATCTTT	TTGGTTAGAG	CCACACCAAG	GTATTTTATA	2303
	TTGTTTGTGA	CTATTGTGAA	TGGTGTCTAT	TCCCTAATTT	CCTTCTCAGC	CTACTTATCC	2363
10	TTTGAGTAGA	GGAAGGCTTC	TGATTTGTTT	GGGTTAATTT	TATACCCAGC	TGCTTTGCTA	2423
	AAGTTCTTTA	TCAGGTTTAG	GTGTTCTCTG	GTGGAACTTT	TGGGGTCACG	TAAGAATACT	2483
15	ATTATATCAT	CTGCAAATAG	TGATATTTCA	CTTCTTCCTT	TCCAATTTCT	ATCCCTCTGG	2543
	GGACTTTTTG	TTGTCTAATT	GCTCTGGCTA	GGACTTCAAA	TTCTATATTG	AATAGATAGG	2603
	GAGAGAGTGG	GCAGCCTTGT	CTAGTTCCTG	GTTTTTCGTGG	GATCGCTTCA	AATTTCTCTC	2663
20	CATTTAGTTT	GATATTGGCT	ACTGGTTTGC	TGTATATGGC	TTTTACTGTA	CTTAGGTATG	2723
	GGCCTTGAAT	TCCTGATATT	TCCAAGACTT	TTAACATGAA	GGGGTTTTGA	AATTTGCCAA	2783
25	ATGCTTTTCTC	AGCATCTAAT	GAGATGATCA	TGTGCCCTCC	CCCCACCTTG	AGTTTGTTTA	2843
	TATAGTGGGT	TACATGAAAG	GATCATTTCT	AATAGTCCAC	AAGTCTGCCA	AATCTTGCTG	2903
	ATTGTGACTC	ATTTCCATAG	CAGGCTCTAT	AACTTCTCTA	ACAGATTGCA	TTAAACTCTG	2963
30	CTTGGGGAAG	GCATTACCTC	TTGGTTGAAG	CAATGTTGTA	GTTTCTATGC	CTGCTGAGTA	3023
	AATAGCCTCA	AGTCCAAGTA	CTTGCCCAGA	CTAATGATCA	AACGTATCCA	GGAGTTCCAT	3083
35	ACCAGAGATG	TACTCTTCTC	TCCTTTGAAG	TACATTGCTG	GAAGAGTAAT	TGTGTTTGCT	3143
	AGAGATACTC	CTTCGAACTG	CAAAAGAAAT	CTCTTGGCTA	AGCATATAAT	CAAGCCTCAG	3203
	GTTTTCTTTT	TATTAAATAG	CTGCTTGTA	GAAAGTGGAC	ACTAAGCATA	TACCTCAAAG	3263
40	GGAGACAGAA	TGACTCTGTG	CCTTCACTGA	TGGAAGTCTG	GGTTACAAAT	TACATCAGAA	3323
	GAACCTATCA	TAGTGAAACA	TCTCATTTCC	CTGGTATAAT	CCCTTCTAGA	AATACACTTG	3383
45	TGACTCTGAA	ATGTTATAAT	CGTGACAACT	AGGCTGTTAC	AGATACACCA	AGTTAAATTT	3443
	GATAGAGAAA	CCAGGCTTGG	AGCCTCATGT	CCATAGGGCA	AGAGGAAGAT	GCTGAGTGTT	3503
	TAAGGTTGGT	TTGAGCGAAG	AACAATACCT	TGTGTCACAA	AAATGAAAGG	AAAAAAGAAA	3563
50	AAAGGAAAGA	AGGAAAGAAA	GAGAGAGAAA	GAAAAAGAAA	GAAAGAAAAA	AAAAAAGAAA	3562

INFORMATION CONCERNANT LA SEQ ID NO:2 :

i) CARACTERISTIQUE DE LA SEQUENCE :

A) LONGUEUR : 1620 paires de base

5 B) TYPE : acide nucléique

C) NOMBRE DE BRINS : double

D) CONFIGURATION : linéaire

ii) TYPE DE MOLECULE : ADN

10 vi) ORIGINE : homme

ix) CARACTERISTIQUE

A) NOM/CLE : ASIC

B) LOCALISATION : 1 .. 1542

15

xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID NO:2 :

20	CCG GTG AGC ATC CAG GCC TTC GCC AGC AGC TCC ACA CTG CAC GGC ATG Pro Val Ser Ile Gln Ala Phe Ala Ser Ser Ser Thr Leu His Gly Met 1 5 10 15	48
25	GCC CAC ATC TTC TCC TAC GAG CGG CTG TCT CTG AAG CGG GCA CTG TGG Ala His Ile Phe Ser Tyr Glu Arg Leu Ser Leu Lys Arg Ala Leu Trp 20 25 30	96
30	GCC CTG TGC TTC CTG GGC TCG CTG GCT GTG CTG CTG TGT GTG TGC ACG Ala Leu Cys Phe Leu Gly Ser Leu Ala Val Leu Leu Cys Val Cys Thr 35 40 45	144
35	GAG CGT GTG CAG TAC TAC TTC CAC TAC CAC CAT GTC ACC AAG CTC GAC Glu Arg Val Gln Tyr Tyr Phe His Tyr His His Val Thr Lys Leu Asp 50 55 60	192
40	GAG GTG GCT GCC TCT CAG CTT ACC TTC CCT GCT GTC ACG CTG TGC AAC Glu Val Ala Ala Ser Gln Leu Thr Phe Pro Ala Val Thr Leu Cys Asn 65 70 75 80	240
45	CTC AAC GAG TTC CGC TTT AGC CAA GTC TCC AAG AAT GAC CTG TAT CAT Leu Asn Glu Phe Arg Phe Ser Gln Val Ser Lys Asn Asp Leu Tyr His 85 90 95	288
50	GCT GGG GAG CTG CTG GCC CTG CTC AAC AAC AGG TAT GAG ATA CCA GAC Ala Gly Glu Leu Leu Ala Leu Leu Asn Asn Arg Tyr Glu Ile Pro Asp 100 105 110	336
55	ACA CAG ATG GCA GAT GAA AAG CAG CTG GAG ATA CTG CAG GAC AAA GCC Thr Gln Met Ala Asp Glu Lys Gln Leu Glu Ile Leu Gln Asp Lys Ala 115 120 125	384
60	AAC TTC CGC AGC TTC AAA CCC AAA CCC TTC AAC ATG CGT GAG TTC TAC Asn Phe Arg Ser Phe Lys Pro Lys Pro Phe Asn Met Arg Glu Phe Tyr 130 135 140	432
65	GAC CGA GCT GGG CAC GAC ATT CGA GAC ATG CTG CTC TCC TGC CAC TTC Asp Arg Ala Gly His Asp Ile Arg Asp Met Leu Leu Ser Cys His Phe 145 150 155 160	480

	CGG GGG GAG GTC TGC AGC GCT GAA GAC TTC AAG GTG GTC TTC ACA CGC	528
	Arg Gly Glu Val Cys Ser Ala Glu Asp Phe Lys Val Val Phe Thr Arg	
	165 170 175	
5	TAT GGA AAG TGC TAC ACG TTC AAC TCG GGC CGA AAT GGG CGG CCG CGG	576
	Tyr Gly Lys Cys Tyr Thr Phe Asn Ser Gly Arg Asn Gly Arg Pro Arg	
	180 185 190	
10	CTG AAG ACC ATG AAG GGT GGG ACG GGC AAT GGG CTG GAA ATC ATG CTG	624
	Leu Lys Thr Met Lys Gly Gly Thr Gly Asn Gly Leu Glu Ile Met Leu	
	195 200 205	
15	GAC ATC CAG CAG GAC GAG TAC CTG CCT GTG TGG GGG GAG ACT GAC GAG	672
	Asp Ile Gln Gln Asp Glu Tyr Leu Pro Val Trp Gly Glu Thr Asp Glu	
	210 215 220	
20	ACG TCT TTC GAA GCA GGC ATC AAA GTG CAG ATC CAT AGT CAG GAT GAA	720
	Thr Ser Phe Glu Ala Gly Ile Lys Val Gln Ile His Ser Gln Asp Glu	
	225 230 235 240	
25	CCT CCT TTC ATC GAC CAG CTG GGC TTT GGC GTG GCC CCA GGC TTC CAG	768
	Pro Pro Phe Ile Asp Gln Leu Gly Phe Gly Val Ala Pro Gly Phe Gln	
	245 250 255	
30	ACC TTT GTG GCC TGC CAG GAG CAG CGG CTC ATA TAC CTG CCC CCA CCC	816
	Thr Phe Val Ala Cys Gln Glu Gln Arg Leu Ile Tyr Leu Pro Pro Pro	
	260 265 270	
35	TGG GGC ACC TGC AAA GCT GTT ACC ATG GAC TCG GAT TTG GAT TTC TTC	864
	Trp Gly Thr Cys Lys Ala Val Thr Met Asp Ser Asp Leu Asp Phe Phe	
	275 280 285	
40	GAC TCC TAC AGC ATC ACT GCC TGC CGC ATC GAC TGT GAG ACG CGC TAC	912
	Asp Ser Tyr Ser Ile Thr Ala Cys Arg Ile Asp Cys Glu Thr Arg Tyr	
	290 295 300	
45	CTG GTG GAG AAC TGC AAC TGC CGC ATG GTG CAC ATG CCA GGG GAT GCC	960
	Leu Val Glu Asn Cys Asn Cys Arg Met Val His Met Pro Gly Asp Ala	
	305 310 315 320	
50	CCA TAC TGT ACT CCA GAG CAG TAC AAG GAG TGT GCA GAT CCT GCT CTG	1008
	Pro Tyr Cys Thr Pro Glu Gln Tyr Lys Glu Cys Ala Asp Pro Ala Leu	
	325 330 335	
55	GAC TTC CTG GTG GAG AAG GAC CAG GAG TAC TGC GTG TGT GAA ATG CCT	1056
	Asp Phe Leu Val Glu Lys Asp Gln Glu Tyr Cys Val Cys Glu Met Pro	
	340 345 350	
60	TGC AAC CTG ACC CGC TAT GGC AAA GAG CTG TCC ATG GTC AAG ATC CCC	1104
	Cys Asn Leu Thr Arg Tyr Gly Lys Glu Leu Ser Met Val Lys Ile Pro	
	355 360 365	
65	AGC AAA GCC TCA GCC AAG TAC CTG GCC AAG AAG TTC AAC AAA TCT GAG	1152
	Ser Lys Ala Ser Ala Lys Tyr Leu Ala Lys Lys Phe Asn Lys Ser Glu	
	370 375 380	

INFORMATION CONCERNANT LA SEQ ID NO:3 :

i) CARACTERISTIQUE DE LA SEQUENCE :

- 5 A) LONGUEUR : 1666 paires de base
 B) TYPE : acide nucléique
 C) NOMBRE DE BRINS : double
 D) CONFIGURATION : linéaire

ii) TYPE DE MOLECULE : ADN

10 vi) ORIGINE : homme

ix) CARACTERISTIQUE

A) NOM/CLE : MDEG

15 B) LOCALISATION : 127 .. 1663

xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID NO:3 :

	TCTGGCGCGA TGCTTACCTT GCGTTCTCTC CCCTGAACGT CAAGGTTTAA GCAGAGCCCG	60
20	AGGACTGGGA GCTCTTCTCT GAAATTCGAT CAACCTGAAG CCAGTTGCGG AACTGCACGG	120
	GGTCCCG ATG GAC CTC AAG GAA AGC CCC AGT GAG GGC AGC CTG CAA CCT	169
	Met Asp Leu Lys Glu Ser Pro Ser Glu Gly Ser Leu Gln Pro	
	1 5 10	
25	TCT AGC ATC CAG ATC TTT GCC AAC ACC TCC ACC CTC CAT GGC ATC CGC	217
	Ser Ser Ile Gln Ile Phe Ala Asn Thr Ser Thr Leu His Gly Ile Arg	
	15 20 25 30	
30	CAC ATC TTC GTG TAT GGG CCG CTG ACC ATC CGG CGT GTG CTG TGG GCA	265
	His Ile Phe Val Tyr Gly Pro Leu Thr Ile Arg Arg Val Leu Trp Ala	
	35 40 45	
35	GTG GCC TTC GTG GGC TCT CTG GGC CTG CTG CTG GTG GAG AGC TCT GAG	313
	Val Ala Phe Val Gly Ser Leu Gly Leu Leu Leu Val Glu Ser Ser Glu	
	50 55 60	
40	AGG GTG TCC TAC TAC TTC TCC TAC CAG CAT GTC ACT AAG GTG GAC GAA	361
	Arg Val Ser Tyr Tyr Phe Ser Tyr Gln His Val Thr Lys Val Asp Glu	
	65 70 75	
45	GTG GTG GCT CAA AGC CTG GTC TTC CCA GCT GTG ACC CTC TGT AAC CTC	409
	Val Val Ala Gln Ser Leu Val Phe Pro Ala Val Thr Leu Cys Asn Leu	
	80 85 90	
50	AAT GGC TTC CGG TTC TCC AGG CTC ACC ACC AAC GAC CTG TAC CAT GCT	457
	Asn Gly Phe Arg Phe Ser Arg Leu Thr Thr Asn Asp Leu Tyr His Ala	
	95 100 105 110	
55	GGG GAG CTG CTG GCC CTG CTG GAT GTC AAC CTG CAG ATC CCG GAC CCC	505
	Gly Glu Leu Leu Ala Leu Leu Asp Val Asn Leu Gln Ile Pro Asp Pro	
	115 120 125	
55	CAT CTG GCT GAC CCC TCC GTG CTG GAG GCC CTG CGG CAG AAG GCC AAC	553
	His Leu Ala Asp Pro Ser Val Leu Glu Ala Leu Arg Gln Lys Ala Asn	
	130 135 140	

	TTC	AAG	CAC	TAC	AAA	CCC	AAG	CAG	TTC	AGC	ATG	CTG	GAG	TTC	CTG	CAC	601
	Phe	Lys	His	Tyr	Lys	Pro	Lys	Gln	Phe	Ser	Met	Leu	Glu	Phe	Leu	His	
			145					150					155				
5	CGT	GTG	GGC	CAT	GAC	CTG	AAG	GAT	ATG	ATG	CTC	TAC	TGC	AAG	TTC	AAA	649
	Arg	Val	Gly	His	Asp	Leu	Lys	Asp	Met	Met	Leu	Tyr	Cys	Lys	Phe	Lys	
		160					165					170					
10	GGG	CAG	GAG	TGC	GGC	CAC	CAA	GAC	TTC	ACC	ACA	GTG	TTT	ACA	AAA	TAT	697
	Gly	Gln	Glu	Cys	Gly	His	Gln	Asp	Phe	Thr	Thr	Val	Phe	Thr	Lys	Tyr	
		175				180					185					190	
15	GGG	AAG	TGT	TAC	ATG	TTT	AAC	TCA	GGC	GAG	GAT	GGC	AAA	CCT	CTG	CTC	745
	Gly	Lys	Cys	Tyr	Met	Phe	Asn	Ser	Gly	Glu	Asp	Gly	Lys	Pro	Leu	Leu	
					195					200					205		
20	ACC	ACG	GTC	AAG	GGG	GGG	ACA	GGC	AAC	GGG	CTG	GAG	ATC	ATG	CTG	GAC	793
	Thr	Thr	Val	Lys	Gly	Gly	Thr	Gly	Asn	Gly	Leu	Glu	Ile	Met	Leu	Asp	
				210					215					220			
25	ATT	CAG	CAG	GAT	GAG	TAC	CTG	CCC	ATC	TGG	GGA	GAG	ACA	GAG	GAA	ACG	841
	Ile	Gln	Gln	Asp	Glu	Tyr	Leu	Pro	Ile	Trp	Gly	Glu	Thr	Glu	Glu	Thr	
			225					230					235				
30	ACA	TTT	GAA	GCA	GGA	GTG	AAA	GTT	CAG	ATC	CAC	AGT	CAG	TCT	GAG	CCA	889
	Thr	Phe	Glu	Ala	Gly	Val	Lys	Val	Gln	Ile	His	Ser	Gln	Ser	Glu	Pro	
		240					245					250					
35	CCT	TTC	ATC	CAA	GAG	CTG	GGC	TTT	GGG	GTG	GCT	CCA	GGG	TTC	CAG	ACC	937
	Pro	Phe	Ile	Gln	Glu	Leu	Gly	Phe	Gly	Val	Ala	Pro	Gly	Phe	Gln	Thr	
		255				260					265					270	
40	TTT	GTG	GCC	ACA	CAG	GAG	CAG	AGG	CTC	ACA	TAC	CTG	CCC	CCA	CCG	TGG	985
	Phe	Val	Ala	Thr	Gln	Glu	Gln	Arg	Leu	Thr	Tyr	Leu	Pro	Pro	Pro	Trp	
					275				280						285		
45	GGT	GAG	TGC	CGA	TCC	TCA	GAG	ATG	GGC	CTC	GAC	TTT	TTT	CCT	GTT	TAC	1033
	Gly	Glu	Cys	Arg	Ser	Ser	Glu	Met	Gly	Leu	Asp	Phe	Phe	Pro	Val	Tyr	
				290					295					300			
50	AGC	ATC	ACC	GCC	TGT	AGG	ATT	GAC	TGT	GAG	ACC	CGC	TAC	ATT	GTG	GAA	1081
	Ser	Ile	Thr	Ala	Cys	Arg	Ile	Asp	Cys	Glu	Thr	Arg	Tyr	Ile	Val	Glu	
			305					310					315				
55	AAC	TGC	AAC	TGC	CGC	ATG	GTT	CAC	ATG	CCA	GGG	GAT	GCC	CCT	TTT	TGT	1129
	Asn	Cys	Asn	Cys	Arg	Met	Val	His	Met	Pro	Gly	Asp	Ala	Pro	Phe	Cys	
		320					325					330					
60	ACC	CCT	GAG	CAG	CAC	AAG	GAG	TGT	GCA	GAG	CCT	GCC	CTA	GGT	CTG	TTG	1177
	Thr	Pro	Glu	Gln	His	Lys	Glu	Cys	Ala	Glu	Pro	Ala	Leu	Gly	Leu	Leu	
		335				340					345					350	
65	GCG	GAA	AAG	GAC	AGC	AAT	TAC	TGT	CTC	TGC	AGG	ACA	CCC	TGC	AAC	CTA	1225
	Ala	Glu	Lys	Asp	Ser	Asn	Tyr	Cys	Leu	Cys	Arg	Thr	Pro	Cys	Asn	Leu	
					355					360					365		

[illegible]

INFORMATION CONCERNANT LA SEQ ID NO:4 :

i) CARACTÉRISTIQUE DE LA SEQUENCE :

A) LONGUEUR : 3647 paires de base

5 B) TYPE : acide nucléique

C) NOMBRE DE BRINS : double

D) CONFIGURATION : linéaire

ii) TYPE DE MOLECULE : ADN

10 vi) ORIGINE : rat

ix) CARACTÉRISTIQUE

A) NOM/CLE : ASIC1B

B) LOCALISATION : 109 .. 1785

15

xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID NO:4 :

CTGCCACAGA GGCTCTGGTG AGGAAGGACA GACAGCTGGA CCGGCGCAGA CCTAGCCGAA 60

20 GTCCAACCTC CGTCCCTTCT GGTGGCTTCT TCCTGTCTCC TGAACAAG ATG CCC ATC 117
Met Pro Ile

1 3

25 CAG ATC TTT TGT TCT GTG TCA TTC TCC TCT GGA GAG GAG GCC CCG GGA 165
Gln Ile Phe Cys Ser Val Ser Phe Ser Ser Gly Glu Glu Ala Pro Gly
5 10 1530 TCC ATG GCA GAT ATC TGG GGT CCC CAC CAC CAC CGG CAG CAG CAG GAC 213
Ser Met Ala Asp Ile Trp Gly Pro His His His Arg Gln Gln Gln Asp
20 25 30 35AGC TCA GAA TCG GAA GAA GAG GAA GAG AAG GAA ATG GAG GCA GGG TCG 261
Ser Ser Glu Ser Glu Glu Glu Glu Lys Glu Met Glu Ala Gly Ser
40 45 5035 GAG TTG GAT GAG GGT GAT GAC TCA CCT AGG GAC TTG GTG GCC TTC GCC 309
Glu Leu Asp Glu Gly Asp Asp Ser Pro Arg Asp Leu Val Ala Phe Ala
55 60 6540 AAC AGC TGT ACC TTC CAT GGT GCC AGC CAT GTG TTT GTG GAA GGG GGC 357
Asn Ser Cys Thr Phe His Gly Ala Ser His Val Phe Val Glu Gly Gly
70 75 8045 CCA GGG CCA AGG CAG GCC TTA TGG GCA GTG GCC TTT GTC ATA GCA CTG 405
Pro Gly Pro Arg Gln Ala Leu Trp Ala Val Ala Phe Val Ile Ala Leu
85 90 9550 GGT GCC TTC CTG TGC CAG GTA GGG GAC CGC GTT GCT TAT TAC CTC AGC 453
Gly Ala Phe Leu Cys Gln Val Gly Asp Arg Val Ala Tyr Tyr Leu Ser
100 105 110 115TAC CCA CAC GTG ACT TTG CTA GAC GAA GTG GCC ACC ACG GAG CTG GTC 501
Tyr Pro His Val Thr Leu Leu Asp Glu Val Ala Thr Thr Glu Leu Val
120 125 130

	TTC CCA GCT GTC ACC TTC TGC AAC ACC AAT GCC GTG CGG TTG TCC CAG	549
	<u>Phe Pro Ala Val Thr Phe Cys Asn Thr Asn Ala Val Arg Leu Ser Gln</u>	
	135 140 145	
5	CTC AGC TAC CCT GAC TTG CTC TAC CTG GCC CCC ATG CTA GGA CTG GAT	597
	<u>Leu Ser Tyr Pro Asp Leu Leu Tyr Leu Ala Pro Met Leu Gly Leu Asp</u>	
	150 155 160	
10	GAG AGT GAT GAC CCC GGG GTG CCC CTT GCT CCT CCT GGC CCA GAG GCT	645
	<u>Glu Ser Asp Asp Pro Gly Val Pro Leu Ala Pro Pro Gly Pro Glu Ala</u>	
	165 170 175	
15	TTC TCC GGG GAG CCT TTT AAC CTC CAT CGT TTC TAT AAT CGC TCT TGC	693
	<u>Phe Ser Gly Glu Pro Phe Asn Leu His Arg Phe Tyr Asn Arg Ser Cys</u>	
	180 185 190 195	
20	CAC CGG CTG GAG GAC ATG CTG CTC TAT TGT TCC TAC TGT GGG GGC CCC	741
	<u>His Arg Leu Glu Asp Met Leu Leu Tyr Cys Ser Tyr Cys Gly Gly Pro</u>	
	200 205 210	
25	TGT GGT CCC CAC AAC TTC TCA GTG GTC TTC ACT CGG TAT GGG AAG TGT	789
	<u>Cys Gly Pro His Asn Phe Ser Val Val Phe Thr Arg Tyr Gly Lys Cys</u>	
	215 220 225	
30	TAC ACA TTC AAC TCG GGC CAA GAT GGG CGG CCA CGG CTG AAG ACC ATG	837
	<u>Tyr Thr Phe Asn Ser Gly Gln Asp Gly Arg Pro Arg Leu Lys Thr Met</u>	
	230 235 240	
35	AAA GGT GGG ACT GGC AAT GGC CTG GAG ATC ATG CTG GAC ATT CAG CAA	885
	<u>Lys Gly Gly Thr Gly Asn Gly Leu Glu Ile Met Leu Asp Ile Gln Gln</u>	
	245 250 255	
40	GAT GAA TAT TTG CCT GTG TGG GGA GAG ACC GAC GAG ACA TCC TTC GAA	933
	<u>Asp Glu Tyr Leu Pro Val Trp Gly Glu Thr Asp Glu Thr Ser Phe Glu</u>	
	260 265 270 275	
45	GCA GGC ATC AAA GTG CAG ATC CAC AGT CAG GAT GAA CCC CCT TTC ATC	981
	<u>Ala Gly Ile Lys Val Gln Ile His Ser Gln Asp Glu Pro Pro Phe Ile</u>	
	280 285 290	
50	GAC CAG CTG GGC TTT GGT GTG GCT CCA GGT TTC CAG ACG TTT GTG TCT	1029
	<u>Asp Gln Leu Gly Phe Gly Val Ala Pro Gly Phe Gln Thr Phe Val Ser</u>	
	295 300 305	
55	TGC CAG GAG CAG AGG CTC ATC TAC CTG CCC TCA CCC TGG GGC ACC TGC	1077
	<u>Cys Gln Glu Gln Arg Leu Ile Tyr Leu Pro Ser Pro Trp Gly Thr Cys</u>	
	310 315 320	
60	AAT GCT GTT ACC ATG GAC TCG GAT TTC TTC GAC TCC TAC AGC ATC ACT	1125
	<u>Asn Ala Val Thr Met Asp Ser Asp Phe Phe Asp Ser Tyr Ser Ile Thr</u>	
	325 330 335	
65	GCC TGC CGG ATT GAT TGC GAG ACG CGT TAC CTG GTG GAG AAC TGC AAC	1173
	<u>Ala Cys Arg Ile Asp Cys Glu Thr Arg Tyr Leu Val Glu Asn Cys Asn</u>	
	340 345 350 355	

[illegible]

	TAATCACATT	TGCTCTGTAA	TATTGCTTGA	GGCTGGGGAT	CGTGATTTC	CCCCAGTTCT	2038
	TTTATTGTTG	AGAATAGTTT	TCTCTATTCT	GGGTTTTCTG	TTATTTCAAA	TGAATCTGCA	2098
5	AATTGCTCTT	CCCATCTCTA	TGAAGAATTG	CGTTGGAATT	TTGATGGGGA	TTGTATTGAA	2158
	TCTGTAGATT	GCCTTTGGTA	AGATGGCCAT	TTTTACTATG	TTAATCCTGC	CAATTCATGA	2218
	GCAAGGGAGA	TCTTTCTATC	TCTGAAATCT	ACTTCAGTTT	CTTCTTCAG	AGACTTGAAG	2278
10	TTCTTGTCAT	AAAAATCTTT	TTGGTTAGAG	CCACACCAAG	GTATTTTATA	TTGTTTGTGA	2338
	CTATTGTGAA	TGGTGTCAAT	TCCCTAATTT	CCTTCTCAGC	CTACTTATCC	TTTGAGTAGA	2398
15	GGAAGGCTTC	TGATTTGTTT	GGGTTAATTT	TATACCCAGC	TGCTTTGCTA	AAGTTCTTTA	2458
	TCAGGTTTAG	GTGTTCTCTG	GTGGAACTTT	TGGGGTCACG	TAAGAATACT	ATTATATCAT	2518
	CTGCAAATAG	TGATATTTCA	CTTCTTCCTT	TCCAATTTCT	ATCCCTCTGG	GGACTTTTTG	2578
20	TTGTCTAATT	GCTCTGGCTA	GGACTTCAAA	TTCTATATTG	AATAGATAGG	GAGAGAGTGG	2638
	GCAGCCTTGT	CTAGTTCCTG	GTTTTCGTGG	GATCGCTTCA	AATTTCTCTC	CATTTAGTTT	2698
25	GATATTGGCT	ACTGGTTTGC	TGTATATGGC	TTTTACTGTA	CTTAGGTATG	GGCCTTGAAT	2758
	TCCTGATATT	TCCAAGACTT	TTAACATGAA	GGGGTTTTGA	AATTTGCCAA	ATGCTTTCTC	2818
	AGCATCTAAT	GAGATGATCA	TGTGCCCTCC	CCCCACCTTG	AGTTTGTTTA	TATAGTGGGT	2878
30	TACATGAAAG	GATCATTTCT	AATAGTCCAC	AAGTCTGCCA	AATCTTGCTG	ATTGTGACTC	2938
	ATTTCCATAG	CAGGCTCTAT	AACTTCTCTA	ACAGATTGCA	TTAAACTCTG	CTTGGGGAAG	2998
35	GCATTACCTC	TTGGTTGAAG	CAATGTTGTA	GTTTCTATGC	CTGCTGAGTA	AATAGCCTCA	3058
	AGTCCAAGTA	CTTGCCGAGA	CTAATGATCA	AACGTATCCA	GGAGTTCCAT	ACCAGAGATG	3118
	TACTCTTCTC	TCCTTTGAAG	TACATTGCTG	GAAGAGTAAT	TGTGTTTGCT	AGAGATACTC	3178
40	CTTCGAACTG	CAAAAGAAAT	CTCTTGCTA	AGCATATAAT	CAAGCCTCAG	GTTTTCTTTT	3238
	TATTAAATAG	CTGCTTGTA	GAAAGTGGAC	ACTAAGCATA	TACCTCAAAG	GGAGACAGAA	3298
45	TGACTCTGTG	CCTTCACTGA	TGGAAGTCTG	GGTTACAAAT	TACATCAGAA	GAACCTATCA	3358
	TAGTGAAACA	TCTCATTTCC	CTGGTATAAT	CCCTTCTAGA	AATACACTTG	TGACTCTGAA	3418
	ATGTTATAAT	CGTGACAACT	AGGCTGTTAC	AGATACACCA	AGTTAAATTT	GATAGAGAAA	3478
50	CCAGGCTTGG	AGCCTCATGT	CCATAGGGCA	AGAGGAAGAT	GCTGAGTGTT	TAAGGTTGGT	3538
	TTGAGCGAAG	AACAATACCT	TGTGTCACAA	AAATGAAAGG	AAAAAAGAAA	AAAGGAAAGA	3598
55	AGGAAAGAAA	GAGAGAGAAA	GAAAAAGAAA	GAAAGAAAAA	AAAAAAGAAA		3647

INFORMATION CONCERNANT LA SEQ ID NO:5 :

i) CARACTERERISTIQUE DE LA SEQUENCE :

A) LONGUEUR 1602 paires de base

5 B) TYPE : acide nucléique

C) NOMBRE DE BRINS : double

D) CONFIGURATION : linéaire

ii) TYPE DE MOLECULE : ADN

10 vi) ORIGINE : rat

ix) CARACTERISTIQUE

A) NOM/CLE : DRASIC

B) LOCALISATION : 1 ... 1602

15

xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID NO:5 :

20	ATG AAA CCT CGC TCC GGA CTG GAG GAG GCC CAG CGG CGA CAG GCC TCA	48
	Met Lys Pro Arg Ser Gly Leu Glu Glu Ala Gln Arg Arg Gln Ala Ser	
	1 5 10 15	
25	GAC ATC CGG GTG TTT GCC AGC AGC TGC ACA ATG CAT GGT CTG GGC CAC	96
	Asp Ile Arg Val Phe Ala Ser Ser Cys Thr Met His Gly Leu Gly His	
	20 25 30	
30	ATC TTT GGC CCT GGA GGC CTG ACC CTG CGC CGA GGG CTG TGG GCC ACA	144
	Ile Phe Gly Pro Gly Gly Leu Thr Leu Arg Arg Gly Leu Trp Ala Thr	
	35 40 45	
35	GCT GTG CTC CTG TCG CTG GCG GCC TTC CTC TAC CAG GTG GCT GAG CGG	192
	Ala Val Leu Leu Ser Leu Ala Ala Phe Leu Tyr Gln Val Ala Glu Arg	
	50 55 60	
40	GTT CGC TAC TAT GGG GAG TTC CAC CAT AAG ACC ACC CTG GAT GAG CGT	240
	Val Arg Tyr Tyr Gly Glu Phe His His Lys Thr Thr Leu Asp Glu Arg	
	65 70 75 80	
45	GAG AGC CAC CAG CTC ACC TTC CCA GCT GTG ACT CTG TGT AAT ATC AAC	288
	Glu Ser His Gln Leu Thr Phe Pro Ala Val Thr Leu Cys Asn Ile Asn	
	85 90 95	
50	CCA CTG CGC CGC TCA CGC CTC ACA CCC AAT GAC TTG CAC TGG GCT GGA	336
	Pro Leu Arg Arg Ser Arg Leu Thr Pro Asn Asp Leu His Trp Ala Gly	
	100 105 110	
55	ACA GCG CTG CTG GGC CTG GAC CCT GCT GAA CAT GCT GCC TAC CTT CGT	384
	Thr Ala Leu Leu Gly Leu Asp Pro Ala Glu His Ala Ala Tyr Leu Arg	
	115 120 125	
60	GCA CTG GGC CAG CCC CCC GCA CCA CCT GGC TTC ATG CCC AGT CCG ACC	432
	Ala Leu Gly Gln Pro Pro Ala Pro Pro Gly Phe Met Pro Ser Pro Thr	
	130 135 140	
65	TTT GAC ATG GCA CAA CTC TAC GCC AGA GCC GGC CAC TCC CTT GAG GAC	480
	Phe Asp Met Ala Gln Leu Tyr Ala Arg Ala Gly His Ser Leu Glu Asp	
	145 150 155 160	

	ATG	TTG	TTG	GAT	TGC	CGA	TAC	CGT	GGC	CAG	CCC	TGT	GGG	CCT	GAG	AAC	528
	Met	Leu	Leu	Asp	Cys	Arg	Tyr	Arg	Gly	Gln	Pro	Cys	Gly	Pro	Glu	Asn	
					165					170					175		
5	TTC	ACA	GTG	ATC	TTT	ACT	CGA	ATG	GGG	CAA	TGC	TAC	ACC	TTC	AAC	TCT	576
	Phe	Thr	Val	Ile	Phe	Thr	Arg	Met	Gly	Gln	Cys	Tyr	Thr	Phe	Asn	Ser	
				180					185					190			
10	GGT	GCC	CAC	GGT	GCA	GAG	CTG	CTC	ACC	ACT	CCA	AAG	GGT	GGT	GCT	GGC	624
	Gly	Ala	His	Gly	Ala	Glu	Leu	Leu	Thr	Thr	Pro	Lys	Gly	Gly	Ala	Gly	
			195					200					205				
15	AAC	GGA	CTG	GAG	ATT	ATG	CTA	GAT	GTA	CAG	CAA	GAG	GAG	TAT	CTG	CCC	672
	Asn	Gly	Leu	Glu	Ile	Met	Leu	Asp	Val	Gln	Gln	Glu	Glu	Tyr	Leu	Pro	
		210					215					220					
20	ATC	TGG	AAG	GAC	ATG	GAA	GAG	ACC	CCG	TTT	GAG	GTG	GGG	ATC	CGA	GTG	720
	Ile	Trp	Lys	Asp	Met	Glu	Glu	Thr	Pro	Phe	Glu	Val	Gly	Ile	Arg	Val	
	225					230					235					240	
	CAG	ATT	CAC	AGC	CAG	GAT	GAG	CCC	CCT	GCC	ATT	GAC	CAG	CTG	GGC	TTC	768
	Gln	Ile	His	Ser	Gln	Asp	Glu	Pro	Pro	Ala	Ile	Asp	Gln	Leu	Gly	Phe	
					245					250					255		
25	GGG	GCA	GCC	CCA	GGC	CAT	CAG	ACT	TTT	GTG	TCC	TGT	CAG	CAG	CAG	CAA	816
	Gly	Ala	Ala	Pro	Gly	His	Gln	Thr	Phe	Val	Ser	Cys	Gln	Gln	Gln	Gln	
				260					265					270			
30	CTG	AGT	TTC	CTG	CCA	CCA	CCC	TGG	GGT	GAC	TGC	AAT	ACC	GCA	TCT	TTG	864
	Leu	Ser	Phe	Leu	Pro	Pro	Pro	Trp	Gly	Asp	Cys	Asn	Thr	Ala	Ser	Leu	
			275					280					285				
35	GAT	CCC	GAC	GAC	TTT	GAT	CCA	GAG	CCC	TCT	GAT	CCC	TTG	GGT	TCC	CCC	912
	Asp	Pro	Asp	Asp	Phe	Asp	Pro	Glu	Pro	Ser	Asp	Pro	Leu	Gly	Ser	Pro	
		290					295					300					
40	AGA	CCC	AGA	CCC	AGC	CCT	CCT	TAT	AGT	TTA	ATA	GGT	TGT	CGC	CTG	GCC	960
	Arg	Pro	Arg	Pro	Ser	Pro	Pro	Tyr	Ser	Leu	Ile	Gly	Cys	Arg	Leu	Ala	
	305					310				315						320	
	TGT	GAG	TCT	CGC	TAT	GTG	GCT	CGG	AAG	TGT	GGC	TGT	CGA	ATG	ATG	CAT	1008
	Cys	Glu	Ser	Arg	Tyr	Val	Ala	Arg	Lys	Cys	Gly	Cys	Arg	Met	Met	His	
					325					330					335		
45	ATG	CCT	GGA	AAC	TCC	CCA	GTG	TGC	AGC	CCC	CAG	CAG	TAC	AAG	GAC	TGC	1056
	Met	Pro	Gly	Asn	Ser	Pro	Val	Cys	Ser	Pro	Gln	Gln	Tyr	Lys	Asp	Cys	
				340					345					350			
50	GCC	AGC	CCA	GCT	CTG	GAC	GCT	ATG	CTG	CGA	AAG	GAC	ACG	TGT	GTC	TGC	1104
	Ala	Ser	Pro	Ala	Leu	Asp	Ala	Met	Leu	Arg	Lys	Asp	Thr	Cys	Val	Cys	
			355					360					365				
55	CCC	AAC	CCG	TGC	GCT	ACT	ACA	CGC	TAT	GCC	AAG	GAG	CTC	TCC	ATG	GTG	1152
	Pro	Asn	Pro	Cys	Ala	Thr	Thr	Arg	Tyr	Ala	Lys	Glu	Leu	Ser	Met	Val	
		370					375					380					

[illegible]

INFORMATION CONCERNANT LA SEQ ID NO:6 :

i) CARACTERISTIQUE DE LA SEQUENCE :

A) LONGUEUR 1948 paires de base

5 B) TYPE : acide nucléique

C) NOMBRE DE BRINS : double

D) CONFIGURATION : linéaire

ii) TYPE DE MOLECULE : ADN

10 vi) ORIGINE : rat

ix) CARACTERISTIQUE

A) NOM/CLE : MDEG2

15 B) LOCALISATION : 16 .. 1707

xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID NO:6 :

CCTCGGGCTG AATGA ATG AGC CGG AGC GGC GGA GCC CGG CTG CCC GCG ACC 51

20 Met Ser Arg Ser Gly Gly Ala Arg Leu Pro Ala Thr
1 5 10

GCG CTC AGC GGC CCG GGA CGC TTC CGT ATG GCC CGC GAG CAG CCG GCG 99

25 Ala Leu Ser Gly Pro Gly Arg Phe Arg Met Ala Arg Glu Gln Pro Ala
15 20 25

CCC GTG GCG GTG GCG GCA GCT AGG CAG CCC GGA GGA GAC CGG AGC GGC 147

30 Pro Val Ala Val Ala Ala Ala Arg Gln Pro Gly Gly Asp Arg Ser Gly
30 35 40

GAT CCG GCG CTG CAG GGG CCA GGG GTC GCC CGC AGG GGG CGG CCG TCC 195

35 Asp Pro Ala Leu Gln Gly Pro Gly Val Ala Arg Arg Gly Arg Pro Ser
45 50 55 60

CTG AGT CGC ACT AAA TTG CAC GGG CTG CGG CAC ATG TGC GCG GGG CGC 243

40 Leu Ser Arg Thr Lys Leu His Gly Leu Arg His Met Cys Ala Gly Arg
65 70 75

ACG GCG GCG GGA GGC TCT TTC CAG CGA CGG GCG CTG TGG GTG CTG GCC 291

45 Thr Ala Ala Gly Gly Ser Phe Gln Arg Arg Ala Leu Trp Val Leu Ala
80 85 90

TTC TGC ACG TCC CTC GGC TTG CTG CTG TCC TGG TCC TCG AAC CGC CTG 339

50 Phe Cys Thr Ser Leu Gly Leu Leu Leu Ser Trp Ser Ser Asn Arg Leu
95 100 105

CTC TAC TGG CTC AGC TTC CCG TCA CAC ACA CGA GTG CAC CGT GAG TGG 387

55 Leu Tyr Trp Leu Ser Phe Pro Ser His Thr Arg Val His Arg Glu Trp
110 115 120

AGC CGC CAG CTG CCG TTC CCC GCC GTC ACC GTG TGC AAC AAC AAC CCC 435

Ser Arg Gln Leu Pro Phe Pro Ala Val Thr Val Cys Asn Asn Asn Pro
125 130 135 140

	CTG CGC TTC CCG CGC CTC TCC AAG GGG GAC CTC TAC TAC GCG GGC CAC	483
	<u>Leu Arg Phe Pro Arg Leu Ser Lys Gly Asp Leu Tyr Tyr Ala Gly His</u>	
	145 150 155	
5	TGG CTA GGG CTG CTG CTT CCC AAC CGC ACC GCG CGC CCG CTG GTC AGC	531
	<u>Trp Leu Gly Leu Leu Leu Pro Asn Arg Thr Ala Arg Pro Leu Val Ser</u>	
	160 165 170	
10	GAG CTG CTG CCG GGC GAC GAG CCG CGC CGC CAG TGG TTC CGC AAA CTG	579
	<u>Glu Leu Leu Arg Gly Asp Glu Pro Arg Arg Gln Trp Phe Arg Lys Leu</u>	
	175 180 185	
15	GCC GAC TTC CGC CTC TTC CTG CCG CCG CGC CAC TTC GAG GGC ATC AGC	627
	<u>Ala Asp Phe Arg Leu Phe Leu Pro Pro Arg His Phe Glu Gly Ile Ser</u>	
	190 195 200	
20	GCT GCC TTC ATG GAC CGT TTG GGC CAC CAG CTG GAG GAT ATG CTG CTC	675
	<u>Ala Ala Phe Met Asp Arg Leu Gly His Gln Leu Glu Asp Met Leu Leu</u>	
	205 210 215 220	
25	TCC TGC AAG TAC CGG GGC GAG CTC TGT GGC CCG CAC AAC TTC TCC TCA	723
	<u>Ser Cys Lys Tyr Arg Gly Glu Leu Cys Gly Pro His Asn Phe Ser Ser</u>	
	225 230 235	
30	GTG TTT ACA AAA TAC GGG AAG TGT TAC ATG TTT AAC TCA GGC GAG GAT	771
	<u>Val Phe Thr Lys Tyr Gly Lys Cys Tyr Met Phe Asn Ser Gly Glu Asp</u>	
	240 245 250	
35	GGC AAG CCG CTG CTC ACC ACG GTC AAG GGG GGG ACG GGC AAC GGG CTG	819
	<u>Gly Lys Pro Leu Leu Thr Thr Val Lys Gly Gly Thr Gly Asn Gly Leu</u>	
	255 260 265	
40	GAG ATC ATG CTG GAC ATT CAG CAA GAT GAG TAC CTG CCC ATC TGG GGA	867
	<u>Glu Ile Met Leu Asp Ile Gln Gln Asp Glu Tyr Leu Pro Ile Trp Gly</u>	
	270 275 280	
45	GAG ACA GAG GAA ACA ACG TTT GAA GCA GGA GTG AAG GTT CAG ATC CAC	915
	<u>Glu Thr Glu Glu Thr Thr Phe Glu Ala Gly Val Lys Val Gln Ile His</u>	
	285 290 295 300	
50	AGT CAG TCT GAG CCG CCT TTC ATC CAA GAG CTG GGC TTT GGG GTG GCT	963
	<u>Ser Gln Ser Glu Pro Pro Phe Ile Gln Glu Leu Gly Phe Gly Val Ala</u>	
	305 310 315	
55	CCG GGG TTC CAG ACC TTC GTG GCC ACA CAA GAG CAG AGG CTC ACA TAT	1011
	<u>Pro Gly Phe Gln Thr Phe Val Ala Thr Gln Glu Gln Arg Leu Thr Tyr</u>	
	320 325 330	
60	CTG CCC CCA CCA TGG GGG GAG TGC CGG TCC TCA GAG ATG GGA CTC GAC	1059
	<u>Leu Pro Pro Pro Trp Gly Glu Cys Arg Ser Ser Glu Met Gly Leu Asp</u>	
	335 340 345	
65	TTC TTT CCT GTT TAC AGC ATC ACA GCC TGT CGG ATT GAC TGT GAG ACC	1107
	<u>Phe Phe Pro Val Tyr Ser Ile Thr Ala Cys Arg Ile Asp Cys Glu Thr</u>	
	350 355 360	

	CGC	TAC	ATC	GTG	GAG	AAC	TGT	AAC	TGC	CGC	ATG	GTC	CAC	ATG	CCA	GGG	1155
	Arg	Tyr	Ile	Val	Glu	Asn	Cys	Asn	Cys	Arg	Met	Val	His	Met	Pro	Gly	
	365					370					375					380	
5	GAC	GCC	CCT	TTC	TGC	ACC	CCT	GAG	CAG	CAC	AAG	GAG	TGT	GCA	GAG	CCT	1203
	Asp	Ala	Pro	Phe	Cys	Thr	Pro	Glu	Gln	His	Lys	Glu	Cys	Ala	Glu	Pro	
					385					390					395		
10	GCC	CTC	GGT	CTA	CTG	GCA	GAA	AAG	GAC	AGC	AAT	TAC	TGT	CTC	TGC	AGG	1251
	Ala	Leu	Gly	Leu	Leu	Ala	Glu	Lys	Asp	Ser	Asn	Tyr	Cys	Leu	Cys	Arg	
				400					405					410			
15	ACA	CCC	TGC	AAC	CTG	ACA	CGC	TAC	AAC	AAA	GAG	CTC	TCC	ATG	GTG	AAG	1299
	Thr	Pro	Cys	Asn	Leu	Thr	Arg	Tyr	Asn	Lys	Glu	Leu	Ser	Met	Val	Lys	
			415					420					425				
20	ATC	CCC	AGC	AAG	ACG	TCA	GCC	AAG	TAC	TTA	GAG	AAG	AAA	TTT	AAC	AAA	1347
	Ile	Pro	Ser	Lys	Thr	Ser	Ala	Lys	Tyr	Leu	Glu	Lys	Lys	Phe	Asn	Lys	
		430					435					440					
25	TCG	GAA	AAA	TAT	ATC	TCA	GAG	AAC	ATT	CTT	GTT	CTG	GAC	ATA	TTT	TTT	1395
	Ser	Glu	Lys	Tyr	Ile	Ser	Glu	Asn	Ile	Leu	Val	Leu	Asp	Ile	Phe	Phe	
	445					450				455					460		
30	GAG	GCG	CTC	AAT	TAC	GAA	ACA	ATT	GAA	CAG	AAG	AAG	GCG	TAT	GAA	GTT	1443
	Glu	Ala	Leu	Asn	Tyr	Glu	Thr	Ile	Glu	Gln	Lys	Lys	Ala	Tyr	Glu	Val	
				465					470						475		
35	GCT	GCC	TTA	CTT	GGT	GAC	ATC	GGT	GGT	CAG	ATG	GGA	CTG	TTC	ATT	GGT	1491
	Ala	Ala	Leu	Leu	Gly	Asp	Ile	Gly	Gly	Gln	Met	Gly	Leu	Phe	Ile	Gly	
				480				485						490			
40	GCT	AGT	CTC	CTC	ACA	ATA	CTA	GAG	CTC	TTT	GAT	TAT	ATT	TAT	GAG	CTG	1539
	Ala	Ser	Leu	Leu	Thr	Ile	Leu	Glu	Leu	Phe	Asp	Tyr	Ile	Tyr	Glu	Leu	
			495					500					505				
45	ATC	AAA	GAG	AAG	CTA	TTA	GAC	CTG	CTT	GGC	AAA	GAA	GAA	GAG	GAA	GGG	1587
	Ile	Lys	Glu	Lys	Leu	Leu	Asp	Leu	Leu	Gly	Lys	Glu	Glu	Glu	Glu	Gly	
		510					515					520					
50	AGC	CAC	GAT	GAG	AAC	ATG	AGC	ACC	TGT	GAC	ACA	ATG	CCA	AAC	CAC	TCT	1635
	Ser	His	Asp	Glu	Asn	Met	Ser	Thr	Cys	Asp	Thr	Met	Pro	Asn	His	Ser	
	525					530					535					540	
55	GAA	ACC	ATC	AGC	CAC	ACT	GTG	AAC	GTG	CCC	CTG	CAG	ACA	GCT	TTG	GGC	1683
	Glu	Thr	Ile	Ser	His	Thr	Val	Asn	Val	Pro	Leu	Gln	Thr	Ala	Leu	Gly	
					545					550					555		
60	ACC	CTG	GAG	GAG	ATT	GCC	TGC	TGA	CACCTCTCAG	GCAACGCAGC	ACCTCCAAAC						1737
	Thr	Leu	Glu	Glu	Ile	Ala	Cys	*									
				560			563										
65	AGACCTTAAA	GGCCCAAGAC	CTAGGACAGG	AGACAGCAAG	CGCAGGTGGG	ATCGCCCCTG											1797
70	ACGACTGAAA	GAAGCAGAGC	CCCCCATATG	CACACATTGC	GAACCTTCTGC	CAAACCTCAC											1857
75	CTGGCCACAT	CTGACATGAA	CCGTCCCGGG	CCCTGCGTCA	TGTCCCTCGC	AGGACCGATG											1917
80	AGTCGCACTC	CGGAAGTGTC	CAAGAAGTAA	C													1948

REVENDICATIONS

1) Protéine constituant un canal cationique neuronal de mammifère sensible à l'amiloride et activé par les protons.

2) Protéine selon la revendication 1 dont la séquence en acides aminés est représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID No : 4 ou un dérivé fonctionnellement équivalent de cette protéine.

3) Protéine selon la revendication 1 dont la séquence en acides aminés est représentée dans la liste de séquence en annexe sous le numéro SEQ ID No : 5 ou un dérivé fonctionnellement équivalent de cette protéine.

4) Canal cationique hybride constitué de l'association d'une première protéine constituant un canal ionique activé par les protons selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 avec une seconde protéine constituant un canal ionique activé ou non par les protons.

5) Canal cationique hybride selon la revendication 4, caractérisé en ce que ladite première protéine est une protéine dont la séquence en acides aminés est représentée dans la liste de séquence en annexe sous le numéro SEQ ID No 1, SEQ ID No 2, SEQ ID No 3, SEQ ID No 4 ou SEQ ID No 5 et la seconde protéine est une protéine dont la séquence en acides aminés est représentée dans la liste de séquence en annexe sous le numéro SEQ ID No : 3 ou SEQ ID No 6.

6) Anticorps monoclonal ou polyclonal dirigé contre au moins une protéine selon l'une quelconque des

revendications 1 à 3 et/ou contre au moins un canal hybride selon l'une quelconque des revendications 4 à 5.

5 7) Molécule d'acide nucléique comprenant ou constituée par une séquence nucléique codant pour une protéine constituant un canal cationique selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 ou un canal hybride selon l'une quelconque des revendications 4 à 5.

10 8) Molécule d'acide nucléique selon la revendication 7 comprenant ou constituée par la séquence nucléique comprise entre les nucléotides 109 et 1785 de la séquence représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID No : 4, ou sa séquence
15 complémentaire.

9) Molécule d'acide nucléique selon la revendication 7 comprenant ou constituée par la séquence nucléique comprise entre les nucléotides 1 et 1602 de la
20 séquence représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID No : 5, ou sa séquence complémentaire.

25 10) Vecteur comprenant au moins une molécule d'acide nucléique selon l'une quelconque des revendications 7 à 9, avantageusement associée à des séquences de contrôle.

30 11) Procédé de production d'une protéine constituant un canal ionique selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 ou un canal hybride selon l'une quelconque des revendications 4 à 5, caractérisé en ce qu'il consiste :

- à transférer une molécule d'acide nucléique selon l'une des revendications 7 à 9 ou un vecteur selon la revendication 10 dans un hôte cellulaire,

5 - à cultiver ledit hôte cellulaire dans des conditions permettant la production de la protéine constituant le canal ionique,

- à isoler, par tous moyens appropriés les protéines constituant les canaux ioniques.

10 12) Procédé d'expression d'une protéine constituant un canal ionique selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 1 à 3 ou un canal hybride selon l'une quelconque des revendications 4 à 5, dans hôte cellulaire, caractérisé en ce qu'il consiste :

15 - à transférer une molécule d'acide nucléique selon l'une des revendications 7 à 9 ou un vecteur selon la revendication 10 dans ledit hôte cellulaire,

20 - à cultiver ledit hôte cellulaire dans des conditions permettant la production de la protéine constituant le canal ionique.

25 13) Procédé selon l'une des revendications 11 ou 12, caractérisé en ce que l'hôte cellulaire est choisi parmi les procaryotes ou les eucaryotes et notamment parmi les bactéries, les levures, les cellules de mammifères, de plantes ou d'insectes.

30 14) Cellule transformée exprimant des canaux cationiques neuronaux de mammifère sensibles à l'amiloride et activés par les protons, obtenue par le procédé selon l'une des revendications 11 à 13.

35 15) Procédé de criblage de substances capables de moduler l'activité de canaux ioniques

neuronaux de mammifère, caractérisé en ce que l'on met en contact des quantités variables d'une substance à tester avec des cellules selon la revendication 14, puis l'on mesure, par tous moyens appropriés, les effets éventuels de ladite substance sur les courants des canaux cationiques sensibles à l'amiloride et activés par les protons.

16) Procédé selon la revendication 15 appliqué au criblage de substances capables de moduler la perception de l'acidité, tant en ce qui concerne la nociception que la transduction du goût.

17) Composition pharmaceutique comprenant comme principe actif au moins une protéine constituant un canal ionique selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 ou un canal hybride selon l'une quelconque 4 à 5 ou encore un anticorps selon la revendication 6.

séquences en annexe sous le numéro SEQ ID NO:1 ou sa séquence complémentaire. Une autre molécule d'ADN selon l'invention est celle représentée dans la liste de séquence en annexe sous le numéro SEQ ID NO : 2 ou sous le
5 numéro SEQ ID NO : 3, ou leur séquence complémentaire.

Une molécule d'ADN comprenant la séquence codant pour la protéine ASIC1B est celle de 3647 pb représentée dans la liste de séquence en annexe sous le numéro SEQ ID NO : 4 ou sa séquence complémentaire. Plus particulièrement l'invention concerne
10 la séquence nucléique comprise entre les nucléotides 109 et 1785 de la séquence représentée dans la liste de séquence en annexe sous le numéro SEQ ID NO : 4 ou sa séquence complémentaire.

Une molécule d'ADN codant pour la protéine DRASIC est celle de 1602 pb représentée dans la liste de séquence en annexe
15 sous le numéro SEQ ID NO : 5 ou sa séquence complémentaire.

Une molécule d'ADN comprenant la séquence codant pour la protéine MDEG2 est celle de 1602 pb représentée dans la liste de séquence en annexe sous le numéro SEQ ID NO : 6 ou sa séquence complémentaire.

20 L'invention concerne également un vecteur comprenant au moins une molécule d'acide nucléique précédente, avantageusement associée à des séquences de contrôle adaptés, ainsi qu'un procédé de production ou d'expression dans un hôte cellulaire d'une protéine constituant un canal ionique selon l'invention. La
25 préparation de ces vecteurs ainsi que la production ou l'expression dans un hôte des canaux de l'invention peuvent être réalisées par les techniques de biologie moléculaire et de génie génétique bien connues de l'homme du métier.

A titre d'exemple, un procédé de production d'une protéine constituant un canal cationique selon l'invention consiste :

30 - à transférer une molécule d'acide nucléique de l'invention ou un vecteur contenant ladite molécule dans un hôte cellulaire,

REVENDICATIONS

1) Protéine constituant un canal cationique neuronal de mammifère sensible à l'amiloride et activé par les protons.

5

2) Protéine selon la revendication 1 dont la séquence en acides aminés est représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ IS No : 1 ou un dérivé fonctionnellement équivalent de cette protéine.

10

3) Protéine selon l'une des revendications 1 ou 2 dont la séquence en acides aminés est représentée dans la liste de séquence en annexe sous le numéro SEQ ID No : 2 ou un dérivé fonctionnellement équivalent de cette protéine.

15

4) Protéine selon l'une des revendications 1 ou 2 dont la séquence en acides aminés est représentée dans la liste de séquence en annexe sous le numéro SEQ ID No : 3 ou un dérivé fonctionnellement équivalent de cette protéine.

20

5) Protéine selon la revendication 1 dont la séquence en acides aminés est représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID No : 4 ou un dérivé fonctionnellement équivalent de cette protéine.

25

6) Protéine selon la revendication 1 dont la séquence en acides aminés est représentée dans la liste de séquence en annexe sous le numéro SEQ ID No : 5 ou un dérivé fonctionnellement équivalent de cette protéine.

30

7) Canal cationique hybride constitué de l'association d'une première protéine constituant un canal

35

ionique activé par les protons selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 avec une seconde protéine constituant un canal ionique activé ou non par les protons.

5 8) Canal cationique hybride constitué de l'association d'une première protéine constituant un canal ionique activé par les protons selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 avec une seconde protéine constituant un canal ionique activé par les protons selon l'une
10 quelconque des revendications 1 à 6.

 9) Canal cationique hybride selon la revendication 8, caractérisé en ce que ladite première
15 protéine est une protéine dont la séquence en acides aminés est représentée dans la liste de séquence en annexe sous le numéro SEQ ID No 1, SEQ ID No 2, SEQ ID No 3, SEQ ID No 4 ou SEQ ID No 5 et la seconde protéine est une
20 protéine dont la séquence en acides aminés est représentée dans la liste de séquence en annexe sous le numéro SEQ ID No : 3 ou SEQ ID No 6.

 10) Anticorps monoclonal ou polyclonal dirigé contre au moins une protéine selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 et/ou contre au moins un canal
25 hybride selon l'une quelconque des revendications 7 à 9.

 11) Molécule d'acide nucléique comprenant ou constituée par une séquence nucléique codant pour une
30 protéine constituant un canal cationique selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 ou un canal hybride selon l'une quelconque des revendications 7 à 9.

 12) Molécule d'acide nucléique selon la revendication 11 comprenant ou constituée par la séquence
35 nucléique comprise entre les nucléotides 123 et 1700 de la

séquence représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID No : 1, ou sa séquence complémentaire.

5 13) Molécule d'acide nucléique selon la revendication 11 comprenant ou constituée par la séquence nucléique comprise entre les nucléotides 1 et 1542 de la séquence représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID No : 2, ou sa séquence
10 complémentaire.

 14) Molécule d'acide nucléique selon la revendication 11 comprenant ou constituée par la séquence nucléique comprise entre les nucléotides 127 et 1663 de la
15 séquence représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID No : 3, ou sa séquence complémentaire.

 15) Molécule d'acide nucléique selon la revendication 11 comprenant ou constituée par la séquence nucléique comprise entre les nucléotides 109 et 1785 de la
20 séquence représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID No : 4, ou sa séquence complémentaire.

25 16) Molécule d'acide nucléique selon la revendication 11 comprenant ou constituée par la séquence nucléique comprise entre les nucléotides 1 et 1602 de la séquence représentée dans la liste de séquences en annexe
30 sous le numéro SEQ ID No : 5, ou sa séquence complémentaire.

 17) Vecteur comprenant au moins une molécule d'acide nucléique selon l'une quelconque des

revendications 11 à 16, avantageusement associée à des séquences de contrôle.

18) Procédé de production d'une protéine
5 constituant un canal ionique selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 ou un canal hybride selon l'une quelconque des revendications 7 à 9, caractérisé en ce qu'il consiste :

10 - à transférer une molécule d'acide nucléique selon l'une des revendications 11 à 16 ou un vecteur selon la revendication 17 dans un hôte cellulaire,

- à cultiver ledit hôte cellulaire dans des conditions permettant la production de la protéine constituant le canal ionique,

15 - à isoler, par tous moyens appropriés les protéines constituant les canaux ioniques.

19) Procédé d'expression d'une protéine
20 constituant un canal ionique selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 ou un canal hybride selon l'une quelconque des revendications 7 à 9, dans hôte cellulaire, caractérisé en ce qu'il consiste :

25 - à transférer une molécule d'acide nucléique selon l'une des revendications 11 à 16 ou un vecteur selon la revendication 17 dans ledit hôte cellulaire,

- à cultiver ledit hôte cellulaire dans des conditions permettant la production de la protéine constituant le canal ionique.

30 20) Procédé selon l'une des revendications 18 ou 19, caractérisé en ce que l'hôte cellulaire est choisi parmi les procaryotes ou les eucaryotes et notamment parmi les bactéries, les levures, les cellules
35 de mammifères, de plantes ou d'insectes.

21) Cellule transformée exprimant des canaux cationiques neuronaux de mammifère sensibles à l'amiloride et activés par les protons, obtenue par le procédé selon l'une des revendications 18 à 20.

5

22) Procédé de criblage de substances capables de moduler l'activité de canaux ioniques neuronaux de mammifère, caractérisé en ce que l'on met en contact des quantités variables d'une substance à tester avec des cellules selon la revendication 21, puis l'on mesure, par tous moyens appropriés, les effets éventuels de ladite substance sur les courants des canaux cationiques sensibles à l'amiloride et activés par les protons.

15

23) Procédé selon la revendication 22 appliqué au criblage de substances capables de moduler la perception de l'acidité, tant en ce qui concerne la nociception que la transduction du goût.

20

24) Composition pharmaceutique comprenant comme principe actif au moins une protéine constituant un canal ionique selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 ou un canal hybride selon l'une quelconque 7 à 9 ou encore un anticorps selon la revendication 10.

25

REVENDEICATIONS

1) Protéine constituant un canal cationique neuronal de mammifère sensible à l'amiloride et activé par les protons, à l'exclusion de la protéine dont la séquence en acides aminés est représentée dans la liste de séquence en annexe sous le numéro SEQ ID No : 3.

2) Protéine selon la revendication 1 dont la séquence en acides aminés est représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ IS No : 1 ou un dérivé fonctionnellement équivalent de cette protéine.

3) Protéine selon l'une des revendications 1 ou 2 dont la séquence en acides aminés est représentée dans la liste de séquence en annexe sous le numéro SEQ ID No : 2 ou un dérivé fonctionnellement équivalent de cette protéine.

4) Protéine selon la revendication 1 dont la séquence en acides aminés est représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID No : 4 ou un dérivé fonctionnellement équivalent de cette protéine.

5) Protéine selon la revendication 1 dont la séquence en acides aminés est représentée dans la liste de séquence en annexe sous le numéro SEQ ID No : 5 ou un dérivé fonctionnellement équivalent de cette protéine.

6) Canal cationique hybride constitué de l'association d'une première protéine constituant un canal ionique activé par les protons selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 avec une seconde protéine constituant un canal ionique activé ou non par les protons.

11) Molécule d'acide nucléique selon la revendication 10 comprenant ou constituée par la séquence

nucléique comprise entre les nucléotides 123 et 1700 de la séquence représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID No : 1, ou sa séquence complémentaire.

5

12) Molécule d'acide nucléique selon la revendication 10 comprenant ou constituée par la séquence nucléique comprise entre les nucléotides 1 et 1542 de la séquence représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID No : 2, ou sa séquence complémentaire.

10

13) Molécule d'acide nucléique selon la revendication 10 comprenant ou constituée par la séquence nucléique comprise entre les nucléotides 109 et 1785 de la séquence représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID No : 4, ou sa séquence complémentaire.

15

14) Molécule d'acide nucléique selon la revendication 10 comprenant ou constituée par la séquence nucléique comprise entre les nucléotides 1 et 1602 de la séquence représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID No : 5, ou sa séquence complémentaire.

20

25

15) Vecteur comprenant au moins une molécule d'acide nucléique selon l'une quelconque des revendications 10 à 14, avantageusement associée à des séquences de contrôle.

30

16) Procédé de production d'une protéine constituant un canal ionique selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 ou un canal hybride selon l'une quelconque des revendications 6 à 8, caractérisé en ce qu'il consiste :

35

- à transférer une molécule d'acide nucléique selon l'une des revendications 10 à 14 ou un vecteur selon la revendication 15 dans un hôte cellulaire,

5 - à cultiver ledit hôte cellulaire dans des conditions permettant la production de la protéine constituant le canal ionique,

- à isoler, par tous moyens appropriés les protéines constituant les canaux ioniques.

10 17) Procédé d'expression d'une protéine constituant un canal ionique selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 ou un canal hybride selon l'une quelconque des revendications 6 à 8, dans hôte cellulaire, caractérisé en ce qu'il consiste :

15 - à transférer une molécule d'acide nucléique selon l'une des revendications 10 à 14 ou un vecteur selon la revendication 15 dans ledit hôte cellulaire,

20 - à cultiver ledit hôte cellulaire dans des conditions permettant la production de la protéine constituant le canal ionique.

25 18) Procédé selon l'une des revendications 16 ou 17, caractérisé en ce que l'hôte cellulaire est choisi parmi les procaryotes ou les eucaryotes et notamment parmi les bactéries, les levures, les cellules de mammifères, de plantes ou d'insectes.

30 19) Cellule transformée exprimant des canaux cationiques neuronaux de mammifère sensibles à l'amiloride et activés par les protons selon l'une des revendications 1 à 8, ou dont la séquence en acides aminés est représentée dans la liste de séquence en annexe sous le numéro SEQ ID No : 3.

35

20) Procédé de criblage de substances capables de moduler l'activité de canaux ioniques neuronaux de mammifère, caractérisé en ce que l'on met en contact des quantités variables d'une substance à tester avec des cellules selon la revendication 19, puis l'on mesure, par tous moyens appropriés, les effets éventuels de ladite substance sur les courants des canaux cationiques sensibles à l'amiloride et activés par les protons.

10

21) Procédé selon la revendication 20 appliqué au criblage de substances capables de moduler la perception de l'acidité, tant en ce qui concerne la nociception que la transduction du goût.

15

22) Composition pharmaceutique comprenant comme principe actif au moins une protéine constituant un canal ionique selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 ou un canal hybride selon l'une quelconque 6 à 8 ou encore un anticorps selon la revendication 9.

20

Met Glu Leu Lys Thr Glu Glu Glu Glu Val Gly Gly Val Gln Pro Val Ser Ile
 Pro Val Ser Ile

Gln Ala Phe Ala Ser Ser Ser Thr Leu His Gly Leu Ala His Ile Phe Ser Tyr
 Gln Ala Phe Ala Ser Ser Ser Thr Leu His Gly Met Ala His Ile Phe Ser Tyr

Glu Arg Leu Ser Leu Lys Arg Ala Leu Trp Ala Leu Cys Phe Leu Gly Ser Leu
 Glu Arg Leu Ser Leu Lys Arg Ala Leu Trp Ala Leu Cys Phe Leu Gly Ser Leu

Ala Val Leu Leu Cys Val Cys Thr Glu Arg Val Gln Tyr Tyr Phe Cys Tyr His
 Ala Val Leu Leu Cys Val Cys Thr Glu Arg Val Gln Tyr Tyr Phe His Tyr His

His Val Thr Lys Leu Asp Glu Val Ala Ala Ser Gln Leu Thr Phe Pro Ala Val
 His Val Thr Lys Leu Asp Glu Val Ala Ala Ser Gln Leu Thr Phe Pro Ala Val

Thr Leu Cys Asn Leu Asn Glu Phe Arg Phe Ser Gln Val Ser Lys Asn Asp Leu
Thr Leu Cys Asn Leu Asn Glu Phe Arg Phe Ser Gln Val Ser Lys Asn Asp Leu

Tyr His Ala Gly Glu Leu Leu Ala Leu Leu Asn Asn Arg Tyr Glu Ile Pro Asp
Tyr His Ala Gly Glu Leu Leu Ala Leu Leu Asn Asn Arg Tyr Glu Ile Pro Asp

Thr Gln Met Ala Asp Glu Lys Gln Leu Glu Ile Leu Gln Asp Lys Ala Asn Phe
Thr Gln Met Ala Asp Glu Lys Gln Leu Glu Ile Leu Gln Asp Lys Ala Asn Phe

Arg Ser Phe Lys Pro Lys Pro Phe Asn Met Arg Glu Phe Tyr Asp Arg Ala Gly
Arg Ser Phe Lys Pro Lys Pro Phe Asn Met Arg Glu Phe Tyr Asp Arg Ala Gly

His Asp Ile Arg Asp Met Leu Leu Ser Cys His Phe Arg Gly Glu Ala Cys Ser
His Asp Ile Arg Asp Met Leu Leu Ser Cys His Phe Arg Gly Glu Val Cys Ser

Ala Glu Asp Phe Lys Val Val Phe Thr Arg Tyr Gly Lys Cys Tyr Thr Phe Asn
Ala Glu Asp Phe Lys Val Val Phe Thr Arg Tyr Gly Lys Cys Tyr Thr Phe Asn

Ser Gly Gln Asp Gly Arg Pro Arg Leu Lys Thr Met Lys Gly Gly Thr Gly Asn
Ser Gly Arg Asn Gly Arg Pro Arg Leu Lys Thr Met Lys Gly Gly Thr Gly Asn

Gly Leu Glu Ile Met Leu Asp Ile Gln Gln Asp Glu Tyr Leu Pro Val Trp Gly
Gly Leu Glu Ile Met Leu Asp Ile Gln Gln Asp Glu Tyr Leu Pro Val Trp Gly

Glu Thr Asp Glu Thr Ser Phe Glu Ala Gly Ile Lys Val Gln Ile His Ser Gln
Glu Thr Asp Glu Thr Ser Phe Glu Ala Gly Ile Lys Val Gln Ile His Ser Gln

Asp Glu Pro Pro Phe Ile Asp Gln Leu Gly Phe Gly Val Ala Pro Gly Phe Gln
Asp Glu Pro Pro Phe Ile Asp Gln Leu Gly Phe Gly Val Ala Pro Gly Phe Gln

Fig. 1

Thr Phe Val Ser Cys Gln Glu Gln Arg Leu Ile Tyr Leu Pro Ser Pro Trp Gly
Thr Phe Val Ala Cys Gln Glu Gln Arg Leu Ile Tyr Leu Pro Pro Pro Trp Gly

Thr Cys Asn Ala Val Thr Met Asp Ser Asp Phe Phe Asp Ser Tyr Ser
Thr Cys Lys Ala Val Thr Met Asp Ser Asp Leu Asp Phe Phe Asp Ser Tyr Ser

Ile Thr Ala Cys Arg Ile Asp Cys Glu Thr Arg Tyr Leu Val Glu Asn Cys Asn
Ile Thr Ala Cys Arg Ile Asp Cys Glu Thr Arg Tyr Leu Val Glu Asn Cys Asn

Cys Arg Met Val His Met Pro Gly Asp Ala Pro Tyr Cys Thr Pro Glu Gln Tyr
Cys Arg Met Val His Met Pro Gly Asp Ala Pro Tyr Cys Thr Pro Glu Gln Tyr

Lys Glu Cys Ala Asp Pro Ala Leu Asp Phe Leu Val Glu Lys Asp Gln Glu Tyr
Lys Glu Cys Ala Asp Pro Ala Leu Asp Phe Leu Val Glu Lys Asp Gln Glu Tyr

Cys Val Cys Glu Met Pro Cys Asn Leu Thr Arg Tyr Gly Lys Glu Leu Ser Met
Cys Val Cys Glu Met Pro Cys Asn Leu Thr Arg Tyr Gly Lys Glu Leu Ser Met

Val Lys Ile Pro Ser Lys Ala Ser Ala Lys Tyr Leu Ala Lys Lys Phe Asn Lys
Val Lys Ile Pro Ser Lys Ala Ser Ala Lys Tyr Leu Ala Lys Lys Phe Asn Lys

Ser Glu Gln Tyr Ile Gly Glu Asn Ile Leu Val Leu Asp Ile Phe Phe Glu Val
Ser Glu Gln Tyr Ile Gly Glu Asn Ile Leu Val Leu Asp Ile Phe Phe Glu Val

Leu Asn Tyr Glu Thr Ile Glu Gln Lys Lys Ala Tyr Glu Ile Ala Gly Leu Leu
Leu Asn Tyr Glu Thr Ile Glu Gln Lys Lys Ala Tyr Glu Ile Ala Gly Leu Leu

Gly Asp Ile Gly Gly Gln Met Gly Leu Phe Ile Gly Ala Ser Ile Leu Thr Val
Gly Asp Ile Gly Gly Gln Met Gly Leu Phe Ile Gly Ala Ser Ile Leu Thr Val

Leu Glu Leu Phe Asp Tyr Ala Tyr Glu Val Ile Lys His Arg Leu Cys Arg Arg
Leu Glu Leu Phe Asp Tyr Ala Tyr Gly Val Ile Lys His Lys Leu Cys Arg Arg

Gly Lys Cys Gln Lys Glu Ala Lys Arg Ser Ser Ala Asp Lys Gly Val Ala Leu
Gly Lys Cys Gln Lys Glu Ala Lys Arg Ser Ser Ala Asp Lys Gly Val Ala Leu

Ser Leu Asp Asp Val Lys Arg His Asn Pro Cys Glu Ser Leu Arg Gly His Pro
Ser Leu Asp Asp Val Lys Arg His Asn Pro Cys Glu Ser Leu Arg Gly His Pro

Ala Gly Met Thr Tyr Ala Ala Asn Ile Leu Pro His His Pro Ala Arg Gly Thr
Ala Gly Met Thr Tyr Ala Ala Asn Ile Val Pro His His Pro Ala Arg Gly Thr

Phe Glu Asp Phe Thr Cys
 Phe Glu Asp Phe Thr Cys

Fig. 1 (suite)

FaNaCh 1 MKY TSAATKPGVFP EHHOHAMMRNRYHPHHCNY
 MEC-4 1 MSWMONLK NYOHLRDPSEYMSOVYGDPLAYLOENTKFVTEREYEDFGYGECFNSSSESEV

MI

ASIC 1 IELKTEEEVGGVOPVSIOAFASSTHGLAHIFSYERLSKRALWALCFGSL
 MDEG 1 MDLKESPSEGSOPSSIOIFANSTLHGIRHIEVYPLTERRVLVAFAFGSL
 FaNaCh 34 SDNRSAID...IAELSESNAHGEAIVT.SRDTKR...VWALV...GF
 MEC-4 61 OCELITG...FDPKLLPYDKRLAWHFKEECYK...AHGIP...NIGE...PNVYRA...VWALV...GF

ASIC 55 LLLCVCGERVOYFCYHHVTKDEVAA SOLT FPAVTLCHNLNEFRFSOVS KNDLYHAG.
 MDEG 54 LLLCVCGERVOYFCYHHVTKDEVAA SOLT FPAVTLCHNLNGFRFSRTTADLYHAG.
 FaNaCh 79 TAAT...LSLLVRKYLO...VVELS...IKDSMP...VQ...V...CH...EPISLRT...RR...VYFNN...
 MEC-4 120 I...LY...NAOSV...DKY...NRNE...VVD...OLKFDT...P...PAVTLCHNLN...P...ASLATS...VOLV...RTLS

ASIC 113 ELLALLNNRYIPDTOMADEKOLEILOKANH...
 MDEG 112 ELLALLDIVNLIPDP...ADP...VLEALROKANE...
 FaNaCh 135 ESONLTWLRFLQKF...FEODS...F...IN...RAFYENL...
 MEC-4 359 E...W...YL...OGGTPTED...NFL...AMGF...ITDEVAIV

ASIC 146 S...KPKPFNN...REFYORAGHDL...DM...LS...CF...FG...A...CSA...D...DFKVVF...T...YGKCYTF
 MDEG 145 H...KPKPFNN...REFLHR...GHDL...DM...LYC...CF...FG...ECGH...D...FTVF...T...YGKCYMF
 FaNaCh 168 GODAKKLS...H...NLED...M...H...C...F...NR...ELCHVS...D...FTFFDGNVFNCTF
 MEC-4 419 TKAKE...NIMFAMATLS...DRER...STTK...P...H...K...S...F...NGKA...CDI...A...DELTHIDPV...GSC...TF

ASIC 198 NSG...DG...P...RLKT...KGGTGNGLEIMLDIOODEYLP...WGETDET...FEAG...KVOIHSQD
 MDEG 197 NSG...DG...P...LTT...KGGTGNGLEIMLDIOODEYLP...WGETDET...FEAG...KVOIHSOS
 FaNaCh 212 NSG...D...R...LOMHATGPENGLS...F...S...K...D...PLP...GTYG...YNFDNNILHSAGV...V...V...H...A...PG
 MEC-4 479 N...H...RTVNLT...S...RAG...PMYGLR...Y...Y...A...S...V...Y...P...TTEA...GV...T...I...H...D...KE

ASIC 254 EPPFI...D...LGFGVAPGFOTFV...C...Q...ORLI...YLP...S...PWG...T...CN...V...T...DS...DFFDS...YSITACRI
 MDEG 253 EPPFI...D...LGFGVAPGFOTFV...T...O...E...ORLT...YLP...P...PWG...E...CR...SE...GL...OFFPV...YSITACRI
 FaNaCh 268 SMPSPV...HG...ID...P...DG...YS...SV...L...K...AIL...HT...RLP...Y...Y...G...NCTNDM...NGIKOYK...Y...F...FACLO
 MEC-4 526 NFP...EPOTFG...VSAPTGVV...S...F...L...RLR...K...S...RLPA...Y...G...D...CV...PDGKTS...D...I...YSNYE...YS...E...GCYR

Fig. 2

```

ASIC      311 DCETRYLVENCNCRMVHMPGDAPM.....CTPEQ
MDEG      310 DCETRYLVENCNCRMVHMPGDAPM.....CTPEQ
FaNaCh    325 LCKORLI...RCGCSSA...PEVPS...NATFCGVIKDWOEINRNHNSNEDHNOSEEDRAFIPTP
MEC-4     586 SCFOOL...KECRCGDP...FVPEG.....ARHCOAADPVARR

ASIC      340 YKECA...PALDFLVEKD...OEYCC...EMPCHLTRYGKELSMVKIP
MDEG      339 HKECAEPALGLLAEKD...SNYCC...CRTPCNLTRYNKELSMVKIP
FaNaCh    385 YLACEEREOKNLNNDRTYELSCGCFOPCSETS...YLS...SYWPLEFYQLSAVERFFKOER
MEC-4     622 CL...ARMNDLGLHG...SFRRC...OOPCGGOSIYSVTYS...PAKWP...SLSLOIOLG

ASIC      381 ...SK...SAKYLAKKFNKSEO...YIGENI
MDEG      380 ...SKT...SAKYLEKKFNKSEK...YISENI
FaNaCh    445 OAGONHFMKT...YEYLEKLAHPS...KHLARNDSHMDIILSKSYSLSSEKEMAKEASDLIR...ENM
MEC-4     670 ...SCNGTAVECNKHYKENG

M II.

ASIC      404 LVLDIFFEV...LYETIEOKKAYE...A...LLGDIGGOMGLFIGAS...LT...LELFDYAYE...IXH...L
MDEG      403 LVLDIFFEA...LYETIEOKKAYE...A...LLGDIGGOMGLFIGAS...LT...LELFDYAYE...ELIKE...L
FaNaCh    505 LRL...LE...LSVVEYROLPAYG...ADLF...DIGGT...GLW...GIS...LT...LEL...EL...RLTGLVF
MEC-4     687 A...LE...F...E...QLN...EMNT...E...EAYGFVNLL...DFGG...GLWCGIS...FLTICCEVFVFLFLETAYMSA

ASIC      464 CRRGKCK...EAKRSSADKG...V...LSLDDVKRHNPC...ES...LRGHPAG...LY...AN...LPHHPARGTFEDF...C
MDEG      463 ...LDL...LGKEEEEGSHDEN...S...T...CD...P...CHSET...SH...V...PLOTALGTLE...C
FaNaCh    565 NSEKGLP...GPTTVNN...NGSNNHSOSTSOHOLY...GYM...HDSHYS...DSAGASVFD...FRRGIVESP...
MEC-4     747 EHNYS...LY...KKKA...EAKKVA...S...GSF

```

Fig. 2 (suite)

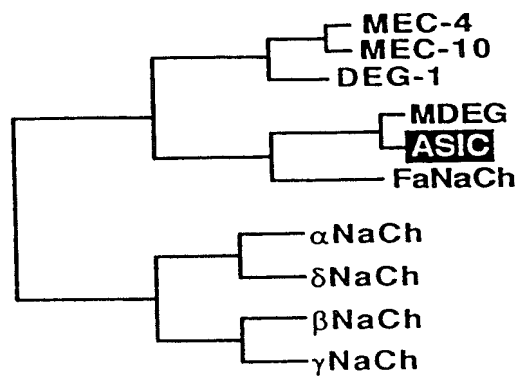


Fig. 3

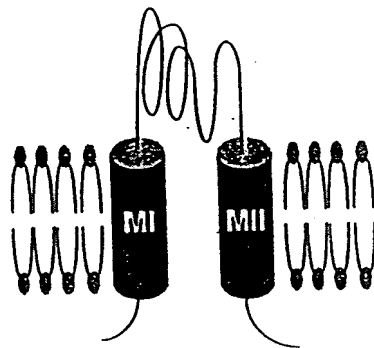


Fig. 4

Fig. 5

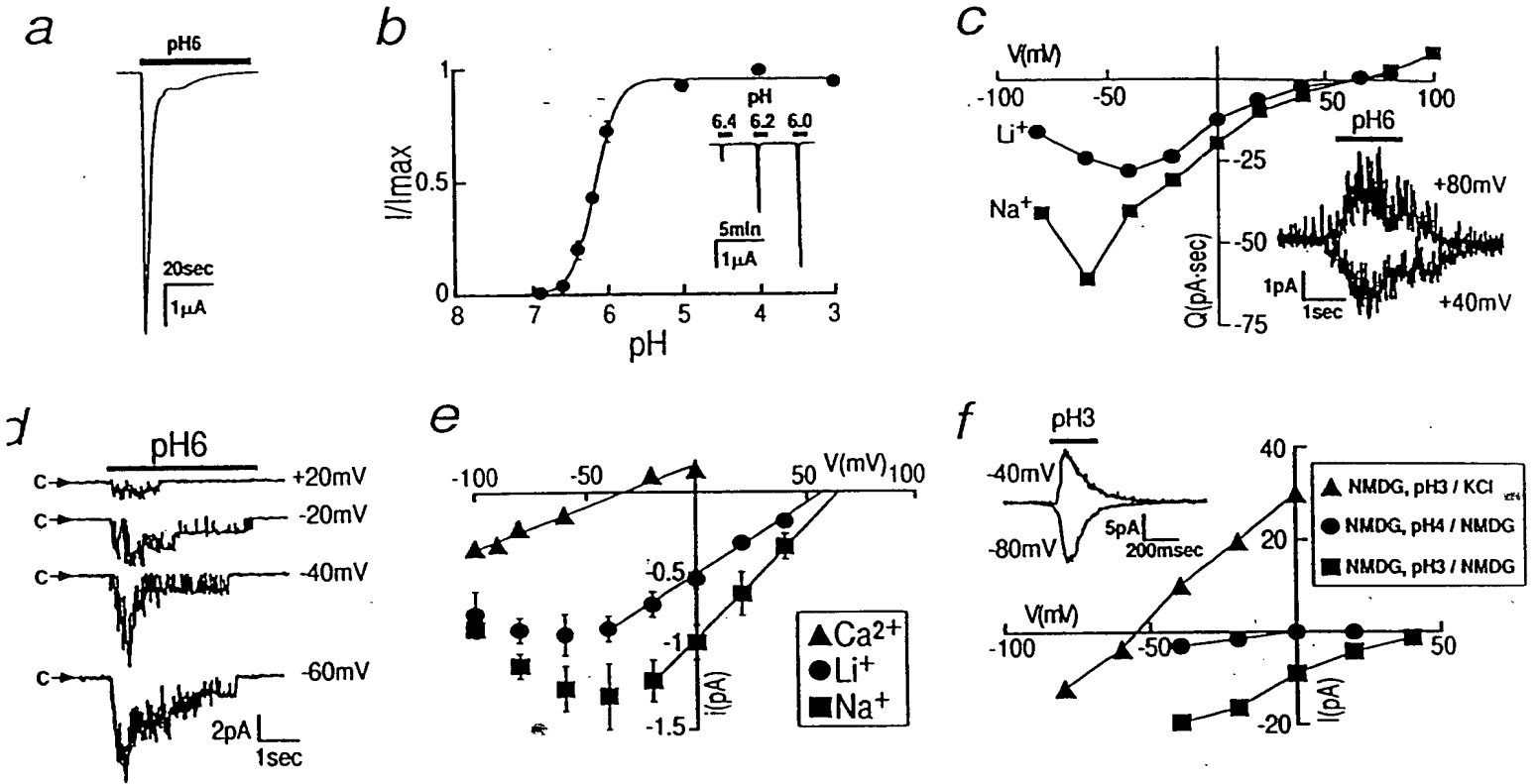


Fig. 6

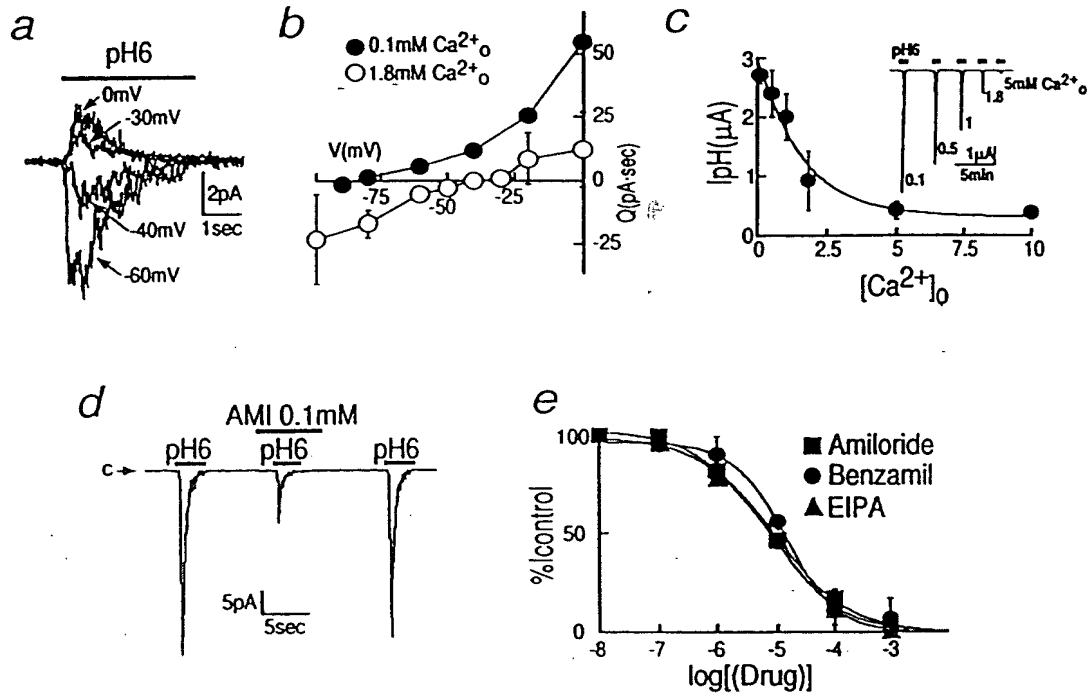


Fig. 7

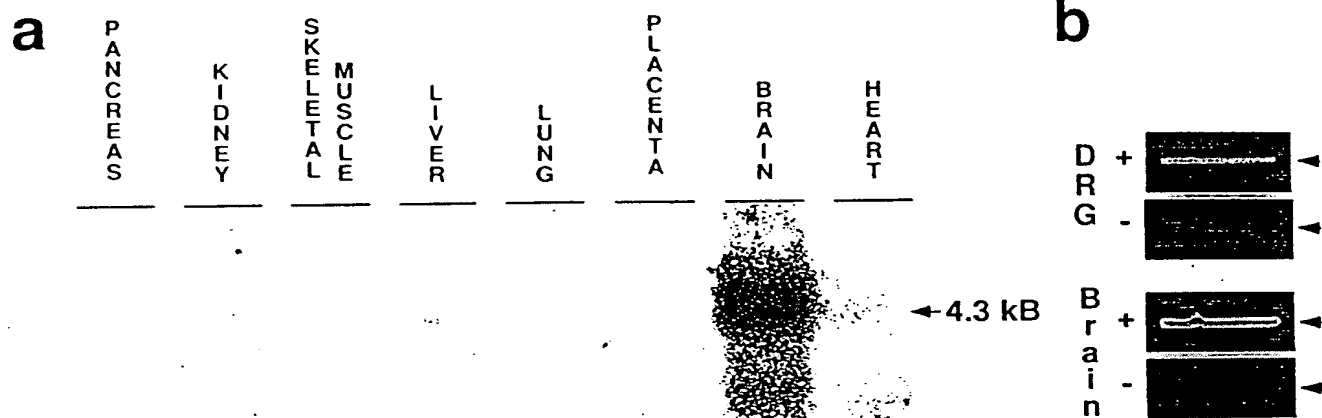
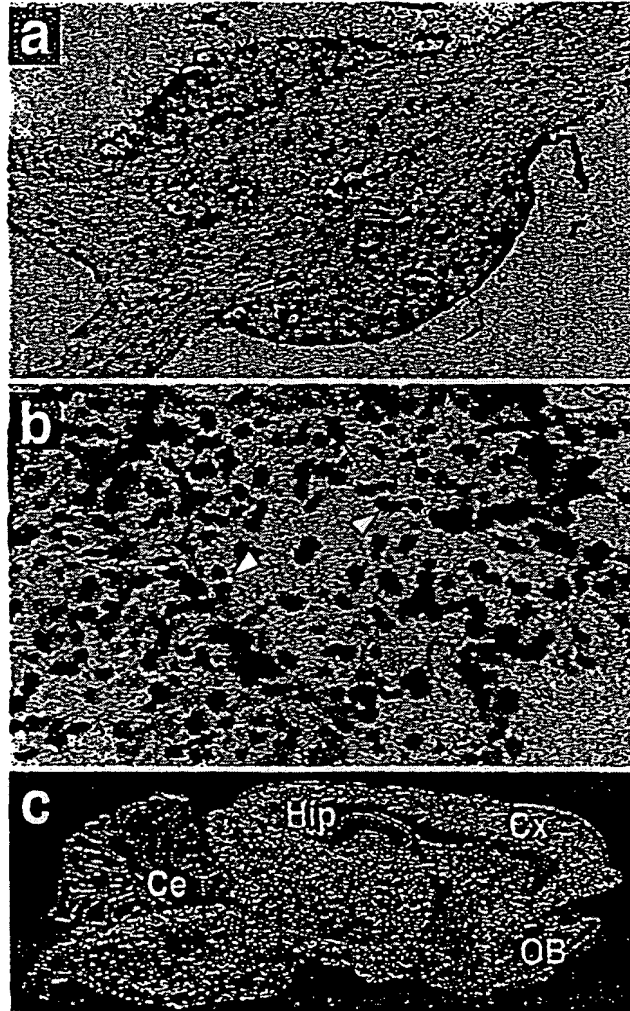


Fig. 8





RAPPORT DE RECHERCHE

articles L.612-14, L.612-17 et R.612-53 à 69 du code de la propriété intellectuelle

OBJET DU RAPPORT DE RECHERCHE

Après l'accomplissement de la procédure prévue par les textes rappelés ci-dessus, le brevet est délivré. L'Institut National de la Propriété Industrielle n'est pas habilité, sauf dans le cas d'absence **manifeste** de nouveauté, à en refuser la délivrance. La validité d'un brevet relève exclusivement de l'appréciation des tribunaux.

L'I.N.P.I. doit toutefois annexer à chaque brevet un "RAPPORT DE RECHERCHE" citant les éléments de l'état de la technique qui peuvent être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention. Ce rapport porte sur les revendications figurant au brevet qui définissent l'objet de l'invention et délimitent l'étendue de la protection.

Après délivrance, l'I.N.P.I. peut, à la requête de toute personne intéressée, formuler un "AVIS DOCUMENTAIRE" sur la base des documents cités dans ce rapport de recherche et de tout autre document que le requérant souhaite voir prendre en considération.

CONDITIONS D'ÉTABLISSEMENT DU PRÉSENT RAPPORT DE RECHERCHE

- ☒ Le demandeur a présenté des observations en réponse au rapport de recherche préliminaire.
- ☐ Le demandeur a maintenu les revendications.
- ☒ Le demandeur a modifié les revendications.
- ☐ Le demandeur a modifié la description pour en éliminer les éléments qui n'étaient plus en concordance avec les nouvelles revendications.
- ☐ Les tiers ont présenté des observations après publication du rapport de recherche préliminaire.
- ☐ Un rapport de recherche préliminaire complémentaire a été établi.

DOCUMENTS CITÉS DANS LE PRÉSENT RAPPORT DE RECHERCHE

La répartition des documents entre les rubriques 1, 2 et 3 tient compte, le cas échéant, des revendications déposées en dernier lieu et/ou des observations présentées.

- ☒ Les documents énumérés à la rubrique 1 ci-après sont susceptibles d'être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention.
- ☒ Les documents énumérés à la rubrique 2 ci-après illustrent l'arrière-plan technologique général.
- ☐ Les documents énumérés à la rubrique 3 ci-après ont été cités en cours de procédure, mais leur pertinence dépend de la validité des priorités revendiquées.
- ☐ Aucun document n'a été cité en cours de procédure.



1.ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE SUSCEPTIBLES D'ETRE PRIS EN CONSIDERATION POUR APPRECIER LA BREVETABILITE DE L'INVENTION	
Référenc des documents (avec indication, le cas échéant, des parties pertinentes)	Revendications du brevet concernées
<p>WALDMANN R ET AL : " THE MAMMALIAN DEGENERIN MDEG, AN AMILORIDE-SENSITIVE CATION CHANNEL ACTIVED BY MUTATIONS CAUSING NEURODEGENERATION IN CAENORHABDITIS ELEGANS "</p> <p>JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Vol. 271, no. 18, 3 mai 1996, Pages 10433-10436, XP002051361 * le document en entier *</p>	1,10,16-18 21,22
<p>GILBERTSON, TIMOTHY A. ET AL. : " Proton Currents through amiloride-sensitive sodium Channels in isolated hamster taste cells : Enhancement By vasopressin and CAMP "</p> <p>NEURON (1993), 10(5), 931-42 CODEN : NERNET ; ISSN : 0896-6273, XP002068540 * page 938 - page 939 *</p>	1,9,10,16-18 20,22
<p>PRICE MP ET AL : " Cloning and expression Of a novel human brain Na⁺channel. "</p> <p>J BIOL CHEM, APR 5 1996, 271 (14) P 7879-82, UNITED STATES, XP002068541 * le document en entier *</p>	1,9,10,16-18 21,22



2.ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE ILLUSTRANT L'ARRIERE-PLAN TECHNOLOGIQUE GENERAL

EMBL databank
Accession number w62694
09-JUN-1996
Marra M et al.
XP002068546

AKAIKE N ET AL : " Proton-induced current in neuronal cells. "
PROG NEUROBIOL, MAY 1994, 43 (1) P73-83,
ENGLAND, XP002068567

WALDMANN R ET AL : " A proton-gated cation channel
Involved in acid-sensing. "
NATURE, MAR 13 1997, 386 (6621) P173-7,
ENGLAND, XP002068589

BASSILANA F ET AL : " The acid-sensitive ionic channel
Subunit ASIC and the mammalian degenerin MDEG form a
Heteromultimeric H⁺-gated Na⁺ channel with novel properties. "
J BIOL CHEM, NOV 14 1997, 272 (46)
P28819-22, UNITED STATES, XP002068543

LINGUEGLIA E ET AL : " A modulatory subunit
Of acid sensing ion channels in brain and dorsal
Root ganglion cells. "
J BIOL CHEM, NOV 21 1997, 272 (47)
P29778-83, XP002068544

BARBRY P ET AL : " Molecular biology of Na⁺ absorption. "
AM J PHYSIOL, SEP 1997, 273 (3 PT 1)
PG571-85, UNITED STATES, XP002068545

3. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE DONT LA PERTINENCE DEPEND DE LA VALIDITE DES PRIORITES

Référence des documents (avec indication, le cas échéant, des parties pertinentes)	Revendications du brevet concernées
NEANT	

THIS PAGE BLANK (USPTO)